

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**INDUCCIÓN DE LA SUBUNIDAD α DEL FACTOR
INDUCIBLE POR HIPOXIA (HIF-1 α) MEDIADA POR EL
FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOLETIVO
VASCULAR (VEGF) EN CONDICIONES NO HIPÓXICAS:
PAPEL DEL RADICAL SUPERÓXIDO EN EL PROCESO
DE SEÑALIZACIÓN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Juan José Peña Deudero

Bajo la dirección de los doctores
Carlos Caramelo Díaz y Francisco Román González Pacheco

Madrid, 2008

• **ISBN: 978-84-692-1091-8**

©Juan José Peña Deudero, 2008

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR I**

**Inducción de la subunidad α del factor inducible por
hipoxia 1 (HIF-1 α) mediada por el factor de
crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en
condiciones no hipóxicas. Papel del radical
superóxido en el proceso de señalización**

**Tesis Doctoral
Juan José Peña Deudero
Madrid, 2008**



**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I
Facultad de Biología
Universidad Complutense de Madrid**

**Inducción de la subunidad α del factor inducible por hipoxia
1 (HIF-1 α) mediada por el factor de crecimiento del endotelio
vascular (VEGF) en condiciones no hipóxicas. Papel del
radical superóxido en el proceso de señalización**

**Trabajo presentado por Juan José Peña Deudero,
licenciado en Biología, para optar
al grado de Doctor**

Directores:

**Dr. Carlos Caramelo Díaz
Dr. Francisco Román González Pacheco**

**Laboratorio de Nefrología e Hipertensión
Fundación Jiménez Díaz-Capio
Madrid, 2008**

Este trabajo ha sido realizado en el Hospital Fundación Jiménez Díaz-Capio, en el Laboratorio de Nefrología e Hipertensión, bajo la dirección del Dr. Carlos Caramelo Díaz y el Dr. Francisco Román González Pacheco y con la ayuda de la Fundación Conchita Rábago, de la Fundación Renal Íñigo Álvarez de Toledo y del Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid 2008.



Capio



FUNDACION
Jiménez Díaz

Capio



FUNDACIÓN RENAL
ÍÑIGO ÁLVAREZ DE TOLEDO





Don **Carlos Caramelo Díaz**, Doctor en Medicina y Profesor Asociado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, y Don **Francisco Román González Pacheco**, Doctor en Ciencias Biológicas,

CERTIFICAN:

que Don **Juan José Peña Deudero**, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado ***Inducción de la subunidad α del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1 α) mediada por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en condiciones no hipóxicas. Papel del radical superóxido en el proceso de señalización***, y que una vez revisado, reúne todos los requisitos exigidos de calidad y originalidad para optar al grado de Doctor.

En Madrid, a 15 de febrero de 2008.

Dr. Carlos Caramelo Díaz

Dr. Francisco Román González Pacheco

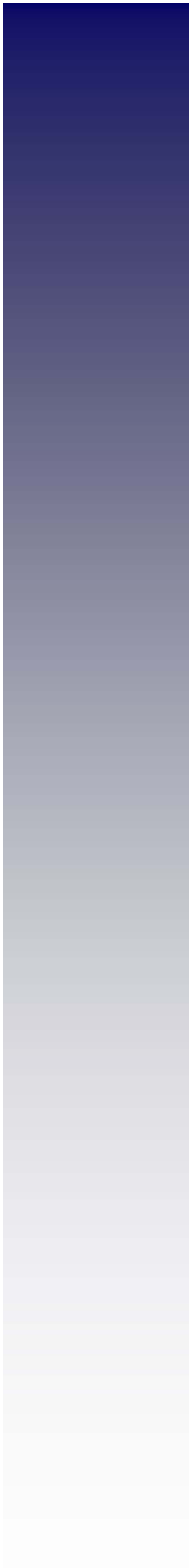
“Quien en presencia de un arduo problema no sienta crecer su entusiasmo ni acrecentar sus fuerzas, quien al aproximarse el solemne momento del fiat lux impacientemente esperado no tenga el alma inundada por la emoción precursora del placer debe abandonar las empresas científicas, porque la Naturaleza no otorga sus favores a los fríos de condición, y la frialdad es a menudo inequívoco signo de impotencia.”

Santiago Ramón y Cajal, Los tónicos de la voluntad

Abreviaturas	1
1. Introducción	7
Factor de crecimiento del endotelio vascular	9
La familia del VEGF	9
Receptores del VEGF presentes en las células endoteliales	10
VEGFR1	11
VEGFR2	11
Funciones del VEGF	12
Mitogénesis, angiogénesis, linfangiogénesis y supervivencia endotelial	12
Incremento de la permeabilidad vascular y efectos hemodinámicos	13
Efectos del VEGF sobre las células de la médula ósea y la hematopoyesis	13
Factor inducible por hipoxia	13
HIF-1 α	15
HIF-2 α	16
HIF-3 α	16
ARNTs	16
Regulación de HIF-1 α	17
PHDs y FIH	17
pVHL	18
Proteasoma	18
Especies reactivas del oxígeno	19
El complejo enzimático de la NADPH oxidasa	20
El estado redox celular	21
VEGF, ROS y HIF-1	22
Implicaciones biológicas y fisiopatológicas de la acción de factores de crecimiento sobre HIF-1	22
Patología tumoral	23
Anemia y Eritropoyesis	23
Enfermedad cardíaca	24
Ictus	24
Tabaco/Humo	24
Preeclampsia y crecimiento intrauterino retardado	24
Patología retiniana	25
Heridas	25
2. Objetivos	27
3. Materiales y métodos	31
Cultivos Celulares	33
Obtención y cultivo primario de células endoteliales de aorta bovina	33
Obtención y cultivo primario de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano	33

Protocolo experimental general	34
Plásmidos, oligonucleótidos antisentidos y método de transfección	34
Método de transfección transitoria en células endoteliales	34
Vectores de expresión	35
Plásmidos reporteros	35
Oligonucleótidos antisentido	35
Análisis proteico	36
Extracción de proteínas	36
Western blot	36
Ensayo de retardo en la movilidad electroforética	37
Análisis de la expresión génica	38
Extracción de ARN	38
RT-PCR	38
Microscopia confocal	38
Inmunofluorescencia	38
Detección de la producción de ROS mediante dihidrorodamina 123	39
Detección de la producción de $O_2^{\cdot-}$ mediante dihidroetidina	39
Detección de la producción de $O_2^{\cdot-}$ por fluorometría	39
Estadística	40
Composición y uso de los medios de cultivo	40
RPMI-1640	40
MEM D-Valina	40
M199	40
Composición y uso de soluciones tamponadas	41
DPBS	41
PBS	41
Tripsina-EDTA	42
Tampón de unión de EMSA	42
TBS y TBT	42
Tampones de extracción de proteínas	43
Tampón de extracción de proteínas citosólicas	43
Tampón de extracción de proteínas nucleares	43
Tampón de extracción de proteínas fosforiladas	43
Inhibidores y antioxidantes	44
Productos y casas comerciales	44
Reactivos	44
Kits comerciales e instrumentación	45
4. Resultados	47

Regulación de la expresión de la proteína de HIF-1α en células endoteliales	49
El VEGF incrementa los niveles de la proteína de HIF-1 α	49
El PIGF incrementa los niveles de la proteína de HIF-1 α pero no la EPO	50
El VEGF incrementa los niveles de ROS	51
No todas las ROS incrementan los niveles de proteína de HIF-1 α	52
El VEGF incrementa los niveles intracelulares de O ₂ ^{•-}	53
La NADPH oxidasa y el O ₂ ^{•-} como mediadores de la acción del VEGF sobre HIF-1 α	55
Rutas de señalización implicadas en la acción del VEGF y el O ₂ ^{•-} sobre HIF-1 α	59
El VEGF no modifica la estabilidad de la proteína de HIF-1 α	61
Regulación del ARNm de HIF-1α en células endoteliales	63
El VEGF y el O ₂ ^{•-} incrementan los niveles del ARNm de HIF-1 α	63
El VEGF aumenta su propia expresión en células endoteliales	64
El VEGF incrementa la actividad transcripcional en su propio promotor	64
El VEGF y el O ₂ ^{•-} incrementan los niveles del ARNm para VEGF	65
El VEGF y el O ₂ ^{•-} incrementan los niveles de la proteína de VEGF	66
5. Discusión	69
El VEGF incrementa los niveles nucleares de la proteína HIF-1α de manera concentración y tiempo dependiente en las células endoteliales y en condiciones de normoxia	71
La EPO no tiene efecto sobre los niveles de HIF-1α en las células endoteliales	72
La capacidad del VEGF para incrementar los niveles de HIF-1α en células endoteliales se debe tanto al VEGFR1 como al VEGFR2	73
El O₂^{•-} producido por los complejos NADPH oxidadas es el mediador de la acción del VEGF sobre HIF-1α en las células endoteliales	74
Las rutas de las JNK, p38 MAPK y PI3K son necesarias para que el VEGF actúe sobre HIF-1α en las células endoteliales	76
El VEGF no modifica la estabilidad de la proteína para HIF-1α, pero si incrementa la expresión de su ARNm en las células endoteliales a través del complejo de la NADPH oxidasa y el O₂^{•-}	76
El VEGF incrementa su propia expresión en las células endoteliales	79
Consideraciones finales	80
6. Conclusiones	83
7. Bibliografía	87
8. Artículos publicados	109



Abreviaturas

ACTH	Hormona adrenocorticotropa o corticotropina
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARH	Receptor aril hidrocarbano
ARNT	Translocador nuclear del receptor aril hidrocarbano
ATP	Adenosina trifosfato
BAEC	Célula/s endotelial/es de aorta bovina
Bcl-2	Proteína de linfoma de célula B 2
bHLH	Motivo hélice-lazo-hélice básico
BSA	Albúmina de suero bovino
CBP	Proteína de unión a CREB
CE	Célula/s endotelial/es
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta a AMPc
DCS	Suero adulto bovino
DMEM	Modificación Dulbecco del medio Eagle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	Solución salina tamponada con fosfatos de Dulbecco
DTT	Ditiotreitol
ECGS	Suplemento para el crecimiento de células endoteliales
ECL	Quimioluminiscencia
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epitelial
EMSA	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética
eNOS	NO sintasa endotelial
EPO	Eritropoyetina
FBS	Suero fetal bovino
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FIH	Factor inhibidor de HIF
GSH	Glutación o glutación reducido
GSSH	Glutación oxidado
HIF-1	Factor inducible por hipoxia 1
HIF-1α	Subunidad α de HIF-1
HIF-1β	Subunidad β de HIF-1
HO•	Radical hidroxilo
HRE	Elementos de respuesta a hipoxia
HRP	Peroxidasa de rábano

HSP	Proteínas de choque térmico
HSPG	Heparina sulfato proteoglicano
HUVEC	Célula/s endotelial/es de cordón umbilical humano
HX	Hipoxantina
ID	Dominio regulador
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico 1
IGFBP-1	Proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 1
IL-1α	Interleuquina 1
IL-6	Interleuquina 6
IPAS	Proteína PAS inhibitoria
JNK	c-Jun N-terminal quinasa
kDa	Kilodalton
L-NAME	L-nitro metilester arginina
M199	Medio 199
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MEK	Proteína quinasa estimuladora de MAPK
MEM	Medio esencial mínimo
MEM D-Val	Medio mínimo esencial con D-Valina
MnTMPyP	Pentacloruro Mn(III)tetraquis(1-metil-4-piridil)porfirin
NAC	N-acetilcisteína
NADPH	Fosfato de β -nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NF-κB	Factor nuclear κ B
NLS	Secuencia de localización nuclear
NO	Óxido nítrico
O₂\cdot^-	Radical aniónico superóxido
ODDD	Dominio de degradación dependiente de oxígeno
ONOO$^-$	Radical aniónico peroxinitrito
PAS	Secuencia común de las proteínas PER, ARNT y SIM
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PER	Del inglés <i>Period homolog</i>
PHD	Enzima con dominio prolina-4 hidroxilasa
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa
PKB/Akt	Proteína quinasa B/Akt
PKC	Proteína quinasa C

PLCγ	Fosfolipasa C γ
PIGF	Factor de crecimiento placentario
PMSF	Fluoruro fenilmetanosulfonil
pVHL	Proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau
Rac1/2	Proteína Ras relacionada con el sustrato C3 de la toxina botulínica
ROS	Especie/s reactiva/s de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	PCR en tiempo real
SDS	Dodecilsulfato sódico
SIM	Del inglés <i>Single-minded homolog</i>
SOD	Superóxido dismutasa
Src	Proteína del oncogen del sarcoma de Rous
sVEGFR1	Receptor soluble de VEGF
TA	Temperatura ambiente
TBS	Tampón Tris salino
TBT	Tampón Tris salino más Tween 20
TGFα/β	Factor de crecimiento transformante α/β
TRX	Tioredoxina
TRXox	Tioredoxina oxidada
TRXred	Tioredoxina reducida
TSH	Hormona estimulante del tiroides u hormona tirotrópica
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR	Receptor de VEGF
VPF	Factor de permeabilidad vascular
XO	Xantina oxidasa



1. Introducción

El factor de crecimiento del endotelio vascular

En 1983, Senger *et al*, publicaron en Science un trabajo donde describían la purificación parcial de una proteína capaz de provocar un aumento en la permeabilidad de los vasos sanguíneos de la piel. Como la proteína fue obtenida a partir del medio de cultivo de una línea tumoral de cobaya, la denominaron factor de permeabilidad vascular tumoral o VPF (*tumor vascular permeability factor*) ¹. El grupo de Senger no pudo secuenciar el VPF de la cobaya hasta 1990 ², pero en 1989, Connolly *et al*, informaron del aislamiento y secuenciación del VPF humano a partir de la línea de células tumorales U937 ³. Ese mismo año, Ferrara y Henzel, informaron del aislamiento y secuenciación de una nueva proteína con capacidad mitogénica sobre las células endoteliales (CE) y a la que denominaron factor de crecimiento del endotelio vascular o VEGF (*vascular endothelial growth factor*) ⁴. Por aquel entonces, se conocía la capacidad del factor de crecimiento fibroblástico ácido y básico (aFGF y bFGF del inglés *acid and basic fibroblastic growth factor*) para producir mitosis sobre las CE (aparte de sobre los fibroblastos), pero al contrario que los FGFs, el VEGF actuaba de modo específico sobre las CE. Sorprendentemente, cuando en el mismo año de 1989 otros dos grupos también secuenciaron de modo independiente el VPF y el VEGF humano ^{5,6}, quedó demostrado que se trataba de la misma proteína.

La familia del VEGF

El VEGF es una glucoproteína homodimérica de unos 45 kDa que presenta una gran homología con el factor de crecimiento derivado de plaquetas o PDGF (*platelet-derived growth factor*) ^{5,6}. Actualmente, el VEGF o VEGFA está considerado el mediador clave de la formación de vasos sanguíneos tanto en la vasculogénesis (formación de vasos en un tejido avascular) como en la angiogénesis (formación de vasos a partir de otros preexistentes) ⁷. Es el miembro mejor estudiado de una familia de ligandos de la que se conocen 4 factores más; VEGFB ⁸, VEGFC ^{9,10}, VEGFD ^{11,12}, y el factor de crecimiento placentario o PIGF (*placental growth factor*) ^{13,14} (Figura 1.1). Existe además un forma presente en el genoma del virus Orf con actividad angiogénica conocido como VEGFE ¹⁵⁻¹⁷ así como un grupo de proteínas presentes en el veneno de serpientes denominados VEGFFs ¹⁸. Preferentemente, VEGF o VEGFA, VEGFB, VEGFE y PIGF, ejercen su acción sobre CE vasculares, mientras que VEGFC y VEGFD lo hacen sobre las CE linfáticas ^{19,20}.

El gen del VEGFA se localiza en el cromosoma 6p21.3 ²¹ y está constituido por 7 intrones y 8 exones ^{22,23} que, por procesamiento alternativo de su ARNm, producen hasta 6 isoformas distintas ⁷. Se denominan anotando como subíndice el número de aminoácidos que poseen, y en el caso del ser humano son; VEGFA₁₂₁, VEGFA₁₄₅, VEGFA₁₆₅, VEGFA_{165b}, VEGFA₁₈₉ y VEGFA₂₀₆. En el ratón, existen las mismas isoformas pero poseen un aminoácido menos cada una. La VEGFA₁₆₅ es la forma predominante y la que posee mayor efecto sobre las CE. De ahora en adelante, cuando hagamos mención al VEGF nos estaremos refiriendo a VEGFA₁₆₅.

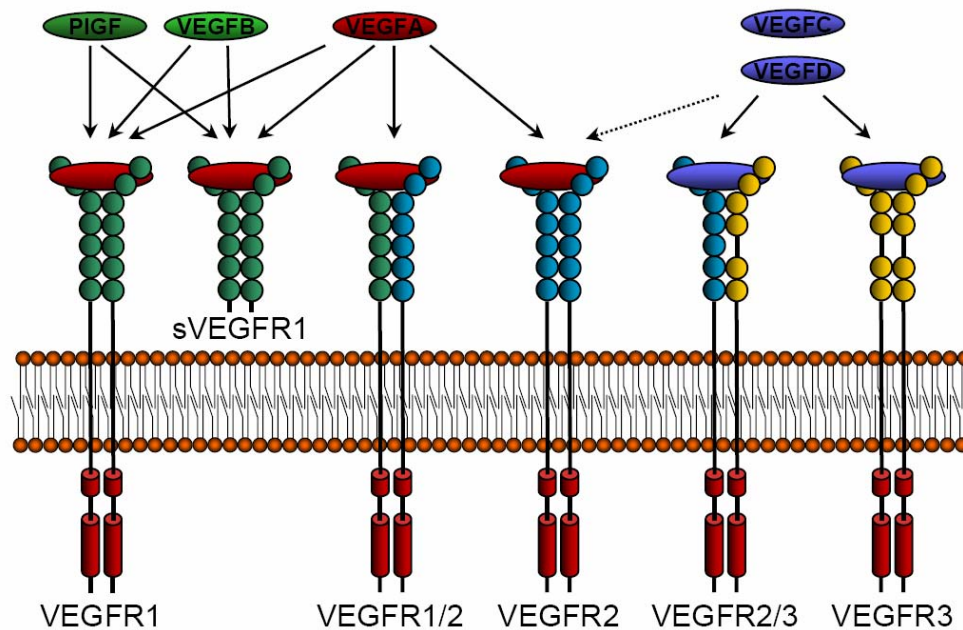


Figura 1.1: Familia del VEGF y sus receptores. El PIGF y el VEGFB sólo pueden unirse a las formas de membrana y soluble de VEGFR1. El VEGFA, el miembro más importante de la familia del VEGF tiene capacidad para unirse tanto a los dos receptores presentes en las CE, VEGFR1 y 2, así como al receptor soluble sVEGFR1 y a los heterodímeros VEGFR1/2. El VEGFC sólo puede interaccionar con VEGFR3 o heterodímeros VEGFR2/3, ambos presentes en CE de vasos linfáticos. EL VEGFD interacciona con los mismos receptores que el VEGFC, y con el VEGFR2 tras sufrir un procesamiento posterior (indicado en la figura con una flecha discontinua y solo para el caso de VEGFD). Esquema adaptado a partir de la figura 1 de Olsson et al Nature Reviews Molecular Cell Biology 2006;7(5):359-377⁷.

Receptores del VEGF presentes en las CE

El VEGF tiene capacidad para unirse a dos receptores homodiméricos denominados VEGFR1 (o Flt-1) y VEGFR2 (o KDR en humanos y Flk-1 en ratón), así como a heterodímeros VEGFR1/VEGFR2. Cada monómero posee siete dominios de tipo inmunoglobulina en la región extracelular encargados del reconocimiento del VEGF, una cadena simple transmembrana y una región intracelular que posee dos regiones con actividad tirosina quinasa (Figura 1.1). Inicialmente, los receptores para el VEGF se identificaron en CE vasculares^{24,25}, pero posteriormente también se encontraron en células de origen hematopoyético²⁶. Además de estos receptores, existe un tercero denominado VEGFR3 o Flt-4²⁷, presente en CE de vasos linfáticos y con capacidad para unirse a VEGFC y VEGFD pero no al VEGF. También pueden encontrarse formas heterodiméricas VEGFR2/3 con capacidad para interaccionar con VEGFC y VEGFD (Figura 1.1). Finalmente, tanto el VEGF como sus receptores, interaccionan con co-receptores HSPGs (*heparan sulphate proteoglycans*) y neuropilinas. Esta interacción modula la respuesta del VEGFR1 y 2 afectando, por ejemplo, a la vida media del complejo receptor-ligando⁷. La mayoría de los efectos reconocidos del VEGF sobre la CE están mediados por el VEGFR2, e incluyen el aumento de permeabilidad vascular, la supervivencia celular y la proliferación. El VEGFR1 también media en el aumento de la permeabilidad vascular.

VEGFR1

El VEGFR1 o Flt-1 fue el primer receptor con actividad tirosina quinasa identificado como VEGFR ²⁸, pero todavía se discute cuales son sus funciones. Todo parece indicar que esas funciones varían dependiendo del estadio de desarrollo o del tipo celular en cuestión. Los homodímeros de VEGFR1 tiene capacidad para reconocer al VEGF en sus formas A y B ²⁹ así como al PlGF ³⁰, pero los heterodímeros de VEGFR1/2 solo pueden unirse al VEGFA. Cuando se une a su ligando, el receptor presenta una menor capacidad de auto fosforilación en tirosina si se compara con el VEGFR2 ²⁸, pero la afinidad por el VEGF es mayor que la del VEGFR2 ³¹. Este hecho, sumado a que se puede demostrar la actividad mitogénica y quimiotáctica del VEGF en CE modificadas para presentar sólo receptores de tipo 2 pero no cuando sólo presentan los de tipo 1, sugieren que el VEGFR1 no es necesario para que el VEGF ejerza sus principales efectos ³². Sin embargo, los ratones deficientes para VEGFR1 mueren antes del nacimiento, por lo que, al menos durante el desarrollo, este receptor es de vital importancia ^{33,34} y persiste por tanto un margen de duda considerable acerca de la posible existencia de otras funciones del VEGFR1. Por otro lado, el VEGFR1 es responsable de la migración de macrófagos inducida por el VEGF ³⁵ así como de la supresión de la maduración de células dendríticas ³⁶, por lo que se ha considerado que el VEGFR1 es un importante mediador del VEGF en células no endoteliales, mientras que en las CE funciona más como un regulador negativo de los efectos del VEGF mediados por el VEGFR2 al poder reducir la cantidad de VEGF disponible. La expresión del VEGFR1 es inducida por la hipoxia a través del factor inducible por hipoxia 1 ³⁷. Finalmente, comentar la existencia de una forma secretada de este receptor, denominada VEGFR1 soluble o sVEGFR1 (o incluso sFlt-1) (Figura 1.1), proveniente de un procesamiento alternativo de su ARNm y que no poseen región transmembrana ni región con actividad quinasa, cuya función parece ser la de bloquear el VEGF soluble e impedir su unión al resto de receptores de membrana ³⁸.

VEGFR2

El VEGFR2 o KDR/Flk-1 reconoce la forma VEGFA ³⁹ así como las forma VEGFD tras sufrir esta un procesamiento enzimático. Las formas VEGF-E y VEGFFs también son reconocidas por este receptor ^{16,17,40}. Al igual que en el caso del VEGFR1, los ratones deficientes para VEGFR2 no son viables y mueren antes del nacimiento debido a graves deficiencias en el sistema vascular ⁴¹. Como mencionamos en el apartado anterior, este receptor tiene menos afinidad por el VEGF que el VEGFR1 ⁴², pero presenta mayor actividad tirosina quinasa ²⁸ y provoca la fosforilación de un mayor número de proteínas intracelulares que el VEGFR1 ³¹, por lo que es considerado el principal mediador de las funciones del VEGF sobre la CE. Entre las proteínas intracelulares activadas tras la unión del VEGF al VEGFR2 podemos encontrar la PI3K, PKB/Akt, proteínas Rac, PLC- γ , PKC, óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), p38 MAPK, HSP27, Raf, MEK, p42/44 MAPK o proteínas de la familia Src ⁷ (Figura 1.2). *In vivo*, la expresión del ARNm para el VEGFR2, al igual que para el VEGFR1, está inducida por la hipoxia ^{43,44}, pero *in vitro* no se ha conseguido observar incremento alguno ⁴⁵. Además, y a diferencia del VEGFR1, la región

promotora del gen para VEGFR2 no posee sitio de unión para los factores inducibles por hipoxia ³⁷.

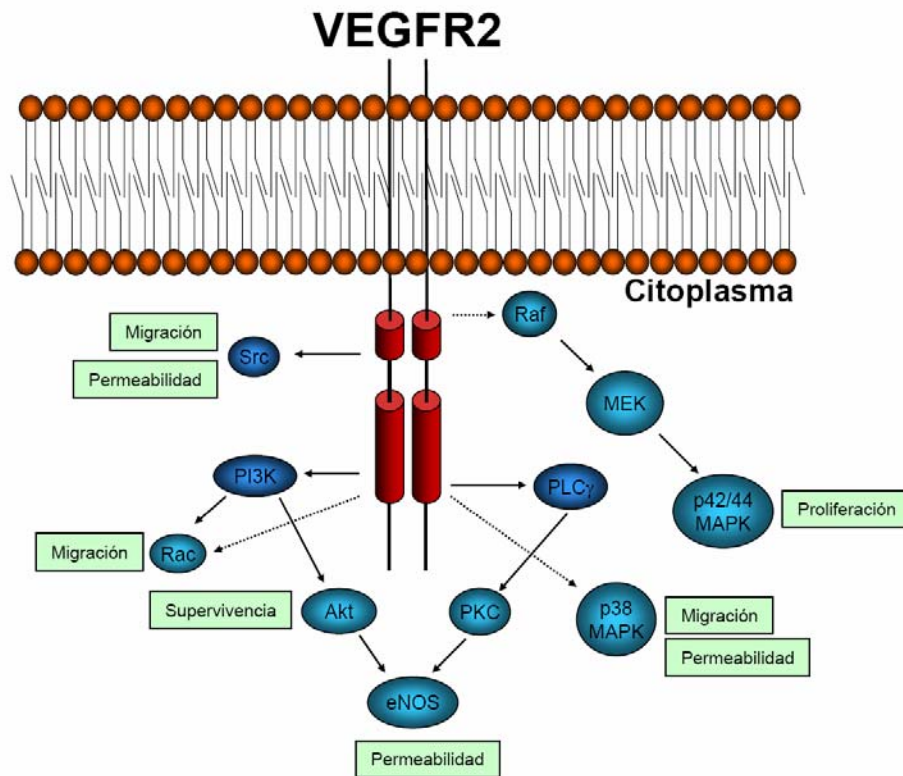


Figura 1.2: Principales proteínas intracelulares activadas a través del VEGFR2 en las CE. Las proteínas dibujadas en azul oscuro son aquellas cuya conexión con el receptor es directa o está bien conocida. Las flechas discontinuas representan las conexiones entre el receptor y proteínas en las que no se conoce con precisión el modo de iniciación de las activaciones correspondientes. Los recuadros recogen la principales funciones biológicas últimas de las vías intracelulares activadas. Esquema adaptado a partir de la figura 2 de Olsson et al *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006;7(5):359-377 ⁷.

Funciones del VEGF

Mitogénesis, angiogénesis, linfoangiogénesis y supervivencia endotelial

Existen multitud de trabajos donde se demuestra la capacidad del VEGF para inducir mitosis de CE procedentes de arterias, venas y vasos linfáticos ⁴⁶⁻⁴⁸, pero además, es capaz de inducir la formación de estructuras de aspecto similar a capilares a partir de cultivos de CE ^{49,50} o anillos aórticos colocados sobre una matriz de colágeno ⁵¹, así como provocar una respuesta angiogénica en tejidos como la cornea ⁵². Por otro lado, aunque el VEGFA no es el inductor más potente, también se conoce su capacidad como generador de linfoangiogénesis ⁵³. Finalmente, VEGF es un factor de supervivencia de la CE tanto *in vitro* como *in vivo*. *In vitro*, el VEGF previene de la muerte por falta de suero en el medio de cultivo ⁵⁴ e induce la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 ⁵⁵ y survivina ⁵⁶. *In*

vivo, es necesario para la correcta formación de la vasculatura ⁵⁷ y favorece la supervivencia de otros tipos celulares como las neuronas ⁵⁸⁻⁶⁰.

Incremento de la permeabilidad vascular y efectos hemodinámicos

Desde que quedó demostrado que VPF y VEGF eran la misma proteína ^{5,6}, a la capacidad del VEGF para provocar mitosis sobre las CE se le sumó la del aumento de la permeabilidad vascular, aunque quedaba por averiguar el modo por el cual ejercía el VEGF sus efectos. En 1997, Bates y Curry descubrieron el papel del Ca^{2+} en este proceso ⁶¹, y posteriores trabajos demostraron la capacidad del VEGF para incrementar los niveles de la eNOS ⁶² y como ésta tiene un papel destacado en la permeabilidad vascular inducida por el VEGF ⁶³. Por otro lado, y parece ser que a consecuencia del incremento de óxido nítrico (NO), el VEGF produce vasodilatación *in vitro* ⁶⁴ y taquicardia e hipotensión *in vivo* ⁶⁵.

Efectos del VEGF sobre las células de la médula ósea y la hematopoyesis

Tras el descubrimiento del VEGF no tardaron en aparecer evidencias sobre sus efectos en la quimiotaxis de monocitos ³⁵ y más tarde sobre su capacidad para incrementar el número de linfocitos B ⁶⁶. Usando técnicas de knockout condicional, se sabe que el VEGF es necesario para que células hematopoyéticas donantes colonicen la médula ósea irradiada del receptor ⁶⁷.

Factor inducible por hipoxia

Los factores inducibles por hipoxia o HIFs (*hypoxia-inducible factors*) son factores de transcripción de tipo hélice-lazo-hélice básico o bHLH (*basic helix-loop-helix*) constituidos por dos subunidades denominadas α y β ⁶⁸. Ambas subunidades pertenecen a una familia de proteínas que comparten una secuencia denominada dominio PAS, denominada así por las iniciales de las tres primeras proteínas descubiertas que tenían en común dicha secuencia; PER (*period homolog*), el translocador nuclear del receptor aril hidrocarbónico o ARNT1 (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*) y SIM (*single-minded homolog*) ^{69,70}. Los HIFs reconocen y se unen a los motivos de secuencia G/ACGTG ⁷⁰ presentes en regiones del ADN nuclear denominadas elementos de respuesta a hipoxia o HREs (*hypoxia-responsive elements*) y que se encuentran asociados a gran número de genes ⁷¹⁻⁷³ (Tabla 1.1), entre los que destacan los de casi todas las enzimas de la glucólisis, así como el transportador de glucosa 1 y 3 (GLUT1 y 3) y los genes de la eritropoyetina (EPO) y la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2).

Producto Génico	Función
Adenilato quinasa 3	Metabolismo de nucleótidos
Adrenomedulina	Tono vascular y supervivencia
Aldolasa A	Metabolismo de la glucosa
Aldolasa C	Metabolismo de la glucosa
Anhidrasa carbónica 9	Regulación del pH
Ceruloplasmina	Metabolismo del Hierro
Ciclina G2	Proliferación
Endotelina 1	Tono vascular, remodelación
Enolasa 1	Metabolismo de la glucosa
Eritropoyetina	Eritropoyesis y supervivencia
Factor de crecimiento del endotelio vascular	Angiogénesis y supervivencia
Factor de crecimiento derivado de insulina 2	Supervivencia y proliferación
Factor de crecimiento transformante $\beta 3$	Angiogénesis y proliferación
Fosfofructoquinasa	Metabolismo de la glucosa
Fosfoglicerato quinasa 1	Metabolismo de la glucosa
Gliceraldehido-3-P-deshidrogenasa	Metabolismo de la glucosa
Hemo oxigenasa-1	Tono vascular y supervivencia
Hexoquinasa 1	Metabolismo de la glucosa
Hexoquinasa 2	Metabolismo de la glucosa
Inhibidor del activador del plasminógeno 1	Angiogénesis
Lactato deshidrogenasa A	Metabolismo de glucosa
NIP3	Apoptosis
Oxido nítrico sintasa 2	Tono vascular y supervivencia
p21	Proliferación
p35srj	Regulación de HIF-1
Piruvato quinasa	Metabolismo de la glucosa
Proil-4-hidroxilasa $\alpha(I)$	Metabolismo del colágeno
Proteína de unión a IGF 1	Supervivencia, proliferación
Proteína de unión a IGF 2	Supervivencia, proliferación
Proteína de unión a IGF 3	Supervivencia, proliferación
Receptor 1 del VEGF	Angiogénesis
Receptor adrenérgico α_{1B}	Tono vascular
Receptor para transferrina	Metabolismo del Hierro
Transferrina	Metabolismo del Hierro
Transportador de glucosa 1	Metabolismo de la glucosa
Transportador de glucosa 3	Metabolismo de la glucosa
Triosa fosfato isomerasa	Metabolismo de la glucosa

Tabla 1.1: Productos génicos de algunos de los genes regulados por HIF-1 y su función fisiológica.

Se conocen 3 tipos distintos de genes para las subunidades α ; HIF-1 α , HIF-2 α y HIF-3 α ^{68,74,75} y 3 para las subunidades β , HIF-1 β o ARNT1, ARNT2 y ARNT3. Las 3

subunidades α tienen capacidad para unirse a cualquiera de las subunidades β , pero dependiendo de que clase de heterodímero se forme, la eficacia del factor de transcripción para incrementar la expresión de sus genes dianas varía ⁷⁶. Los ARNm para ambos tipos de subunidades así como sus productos proteicos se expresan de modo constitutivo, pero en condiciones de normoxia las subunidades α se encuentran en continua degradación ⁷⁷. A continuación pasaremos a describir brevemente cada una de estas proteínas.

HIF-1 α

Tras unirse a HIF-1 β /ARNT1 constituye, de entre todos los HIFs, el principal regulador de la expresión de genes con secuencias HREs en su región promotora. HIF-1 α está presente en todos los eucariotas, en todo tipo celular y tanto en tejidos adultos como embrionarios ⁷⁸. Se trata de una proteína vital para el desarrollo ya que regula la expresión de genes necesarios para la correcta formación del sistema vascular; los embriones deficientes homocigotos para el gen de HIF-1 α fracasan antes del nacimiento ⁷⁹. Dada su importancia, sigue siendo el más estudiado de todos los HIFs.

HIF-1 α posee un dominio bHLH en el extremo N-terminal responsable del reconocimiento de las regiones HREs y, junto con los dominios PAS, de la unión al ADN ^{71,80}. La región PAS también es responsable de la unión con la subunidad β . La regulación de la degradación de HIF-1 α en condiciones de normoxia se realiza en el dominio de degradación dependiente de oxígeno o ODDD (*oxygen-dependent degradation domain*) donde se localizan las prolinas 402 y 564 y la leucina 493 necesarias para iniciar el proceso de degradación de la proteína ⁸¹. HIF-1 α también posee dos dominios de transactivación o TADs (*transactivation domain*). El más cercano al extremo N-terminal se encuentra dentro de la región ODDD y es necesario para la unión con la proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau o pVHL (*von Hippel-Lindau tumor supresor protein*) ^{82,83}. El dominio TAD cercano al extremo C-terminal es necesario para la unión a p300 o a la proteína de unión a CREB o CBP (*CREB binding protein*), dos proteínas muy similares que actúan como puente entre algunos factores de transcripción y la maquinaria de transcripción ⁸⁴. La secuencia de localización nuclear o NLS (*nuclear localization signal*) en el dominio regulador (ID) es necesaria para que HIF-1 α pueda ser transportado al interior del núcleo (Figura 1.3).

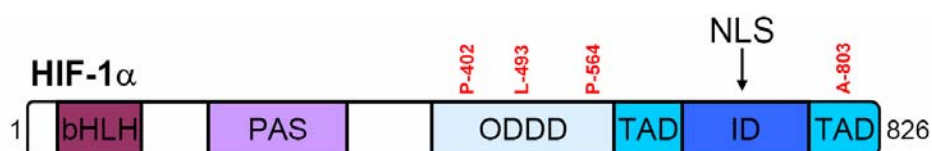


Figura 1.3: Estructura de la proteína para HIF-1 α . Se muestran los principales residuos responsables de la regulación de HIF-1 α : las prolinas 402 y 564, la leucina 493 y asparagina 803. **bHLH**: dominio hélice-lazo-hélice, **PAS**: dominio PAS, **ODDD**: dominio de degradación dependiente de oxígeno, **TAD**: dominio de transactivación, **ID**: dominio regulador, **NLS**: secuencia de localización nuclear.

HIF-2 α

Hasta la fecha, se sabe que esta subunidad comparte funciones con HIF-1 α regulando los mismos genes, pero solo en aquellos tipos celulares donde se expresa. Esta parece la mayor diferencia con respecto a HIF-1 α ya que, al contrario que HIF-1 α , la forma 2 α sólo ha sido detectada en CE, en riñón, en células catecolaminérgicas y en el pulmón durante el desarrollo ⁷⁸. Los embriones de ratón HIF-2 α ^{-/-} tampoco son viables pero el fracaso en el desarrollo ocurre en fases más avanzadas y se debe a deficiencias en la producción de catecolaminas ⁸⁵ y no a alteraciones en el desarrollo vascular como ocurre en el caso de HIF-1 α . HIF-2 α comparte una estructura muy similar a HIF-1 α y su expresión también se regula por la concentración de O₂, pero además, HIF-2 α posee un residuo de cisteína en la región de unión con la subunidad ARNT que puede permitir una regulación específica por variaciones del estado redox celular ⁸⁶.

HIF-3 α

Al igual que HIF-1 α o HIF-2 α , la expresión de la proteína para HIF-3 α está regulada por la concentración de oxígeno, pero al contrario que los anteriores, los heterodímeros formados por HIF-3 α /ARNT apenas tiene capacidad para inducir la expresión de los genes regulados por HIFs. Parece ser que, a través de sus isoformas más comunes, actúa como regulador negativo al impedir la acción de HIF-1 y HIF-2 ^{87,88}. La más estudiada es una forma denominada proteína PAS inhibitoria o IPAS (*inhibitory PAS protein*) que no posee la región TAD en la zona C-terminal y que dimeriza con HIF-1 α formando un complejo sin capacidad transcripcional ⁸⁹. El que tanto IPAS y HIF-1 α se induzcan en los mismos tejidos y bajo situaciones hipóxicas continua siendo tema de estudio y discusión.

ARNTs

Al igual que las subunidades α , las distintas subunidades ARNTs se encuentran expresadas de manera diferente. HIF-1 β o ARNT1, al igual que HIF-1 α se encuentra presente en todos los tejidos adultos y en desarrollo de humanos y ratones, mientras que ARNT2 sólo se expresa en riñón y cerebro ^{78,90,91}. En cuanto a la estructura, comparten los dominios PAS y bHLH del mismo modo que las subunidades α y posee una región TAD en el extremo C-terminal implicada en la regulación de la actividad transcripcional del factor (Figura 1.4). A diferencia de las subunidades α , la secuencia NLS se localiza en el extremo N-terminal y no posee dominios ODDD. Por tanto, su degradación no es dependiente de la concentración de oxígeno y son estables durante mucho más tiempo. Los ARNTs también interactúan con el receptor aril hidrocarbónico o AHR (*aryl hydrocarbon receptor*), PER y SIM para constituir factores de transcripción que actúan durante el desarrollo del sistema nervioso central.

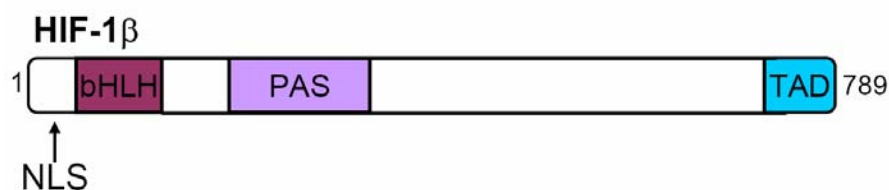


Figura 1.4: Estructura de la proteína para HIF-1 β . **bHLH**: dominio hélice-lazo-hélice, **PAS**: dominio PAS, **TAD**: dominio de transactivación, **NLS**: secuencia de localización nuclear.

Regulación de HIF-1 α

Para constituirse un heterodímero HIF dentro del núcleo, la subunidad α tiene que translocarse y ser capaz de unirse a la subunidad β . El mejor y más estudiado estímulo capaz de estabilizar a HIF-1 α es la hipoxia. Por debajo de una presión parcial de O₂ del 6% y mediante técnicas de Western blot, comienza a observarse un incremento de la proteína para HIF-1 α ⁷⁷. Esta estabilidad se alcanza rápidamente y es debida a que la ruta de degradación de HIF-1 α , por déficit de O₂, queda bloqueada. En condiciones de normoxia, los residuos de prolina (402 y 564) localizados dentro de la región ODDD (Figura 1.3) son hidroxilados mediante la acción de enzimas con dominios prolina-4 hidroxilasas denominados PHDs (*prolyl-hydroxylase domain*) ^{81,92,93}. Estas hidroxilaciones constituyen la primera señal para la degradación de HIF-1 α ⁹⁴. Del mismo modo, un residuo de asparagina (803) localizado en el dominio TAD del extremo C-terminal (Figura 1.3) es hidroxilado por el factor inhibidor de HIF o FIH (*factor inhibiting HIF*) ⁹⁵, pero a diferencia de las hidroxilaciones anteriores, la hidroxilación del residuo de asparagina no interviene en la degradación de HIF-1 α . Tras las hidroxilaciones en prolinas, un complejo multienzimático reconoce dichos sitios y liga una cadena de poliubiquitina que servirá de señal al proteasoma para degradar a HIF-1 α . A continuación, pasaremos a describir cada una de las proteínas implicadas en la degradación dependiente de oxígeno de HIF-1 α .

PHDs y FIH

Las PHDs y el FIH son enzimas con capacidad para hidroxilar a HIF-1 α pero que poseen una gran homología con la familia de hidroxilasa de residuos de prolina del colágeno y con la gran familia de oxigenasas que requieren de hierro como co-substrato ⁹⁶. Estas hidroxilasas son totalmente dependientes de O₂, Fe²⁺ y 2-oxoglutarato. Concretamente, el uso de quelantes de Fe²⁺ como la desferoxamina mimetiza una situación hipóxica al inhibir la acción de las PHDs y bloquear la degradación de HIF-1 α ⁶⁸.

Se han descrito tres PHDs; PHD1, 2 y 3 ^{92,93} con capacidad para hidroxilar a los residuos de prolina 402 y 564 de HIF-1 α y una única forma de FIH capaz de hidroxilar el residuo de asparagina 803 ⁹⁵ (Figura 1.3). Mediante el empleo de técnicas de ARN de interferencia para inhibir la actividad de las PHDs ha podido demostrarse que la PHD2 es la principal responsable de la hidroxilación de HIF-1 α ⁹⁷. De las dos residuos de prolina, la

564 es fundamental para que HIF-1 α pueda degradarse. La asparagina no interviene en el proceso de degradación, pero si regula la capacidad transcripcional de HIF-1; mientras esta se encuentre hidroxilada, el factor no puede interactuar con la proteína nuclear p300 o CBP, necesaria para el correcto funcionamiento de la actividad transcripcional de HIF-1 ⁹⁸.

pVHL

Una vez hidroxilada la prolina 564, la proteína pVHL reconoce la región comprendida entre los residuos 549-582 y se une a HIF-1 α ^{81-83,99-102}. pVHL es la proteína de reconocimiento de un complejo multienzimático que une una cadena de poliubiquitina a HIF-1 α marcándolo como diana de degradación por el proteasoma. Junto a pVHL, el complejo está constituido por las proteínas elongina B, elongina C, Cul2 y Rbx y la ligasa E3.

La ubiquitina es una pequeña proteína (8,6 kDa) de secuencia muy conservada presente en todos los eucariotas. El denominado sistema de la ubiquitina constituye el principal mecanismo de la célula para regular numerosas proteínas mediante un proceso de degradación selectiva ¹⁰³ y de su correcto funcionamiento depende procesos tan importantes como la transducción de señales, el ciclo celular o la apoptosis. La ubiquitina sufre una activación a través de la acción de las enzimas E1 y E2 para poder formar polímeros una vez ligada a la proteína diana (en nuestro caso HIF-1 α) a través de la ligasa E3. El Co²⁺ puede simular un estado hipóxico al impedir la interacción entre HIF-1 α y pVHL aun cuando exista hidroxilación, impidiendo que continúe el proceso de marcaje con ubiquitina ¹⁰⁴ y bloqueando la degradación de HIF-1 α . De ahí que el uso de CoCl₂ constituya una práctica habitual en los estudios sobre regulación de los HIFs.

Proteasoma

El proteasoma ¹⁰⁵ es la etapa final en la degradación de HIF-1 α . El complejo del proteasoma reconoce a HIF-1 α ubiquitinizado y procede a la degradación proteolítica. El proteasoma de mamíferos o proteasoma 26S es un complejo multiproteico compuesto por 4 anillos heptaméricos apilados en forma de cilindro hueco, conocido como proteasoma 20S, dos “bases” y dos “tapaderas” (*base* y *lid* en inglés). Las bases también tienen forma de anillo, pero están constituidas por 9 monómeros cada una. Cada anillo base se localiza en un extremo del proteasoma 20S. Las tapaderas están formadas por 8 monómeros y se localizan sobre las bases. Las tapaderas se encargan del reconocimiento de proteínas ubiquitinizadas, es decir, son las responsables de reconocer qué proteínas están marcadas para su degradación, mientras que los anillos bases se encargan de desdoblar las proteínas reconocidas para degradación e introducir las en el proteasoma 20S, que será quien finalmente realice la proteólisis ¹⁰⁶. En nuestro caso, la CE, la eficacia de este sistema de degradación; hidroxilación, reconocimiento por pVHL, marcaje con ubiquitina y proteólisis a través del proteasoma, es tan eficaz, que hace casi indetectable la proteína de HIF-1 α mediante técnicas de Western blot y en condiciones de normoxia.

Especies reactivas del oxígeno

En biología, el término especies reactivas del oxígeno o ROS (*reactive oxygen species*) incluye iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos (Tabla 1.2). Son formas químicas derivadas del oxígeno molecular con gran capacidad para reaccionar con otras moléculas y estructuras de la célula y de naturaleza orgánica o inorgánica. La naturaleza radical o no de la especie reside en si posee o no algún electrón desapareado independientemente de la carga, aunque en caso de poseer carga, se habla de radical iónico, este sería el caso del radical aniónico superóxido ($O_2^{\cdot-}$)¹⁰⁷.

Radicales	No radicales
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
Hidroxilo ($HO\cdot$)	Ácido hipocloroso ($HOCl$)
Hidroperoxilo ($HOO\cdot$)	Ozono (O_3)
Alcoxilo ($RO\cdot$)	Singlete de oxígeno (1O_2)
Peroxilo ($ROO\cdot$)	

Tabla 1.2: Especies reactivas del oxígeno según su naturaleza radical o no radical.

En el caso de mamíferos, aproximadamente el 90% del O_2 consumido es reducido hasta formar H_2O durante el proceso de la respiración que tiene lugar en las mitocondrias¹⁰⁸. Sin embargo, como todo proceso bioquímico, la reducción del O_2 hasta H_2O puede ser incompleta, produciéndose especies químicamente muy inestables y de modo general con gran capacidad oxidante; las ROS. Además de a través de reducciones incompletas durante la respiración celular, la célula recibe y produce distintas ROS a través de diversos procesos enzimáticos y reacciones químicas. Por otro lado, la célula posee sistemas de eliminación de ROS o sistemas antioxidantes que incluyen enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), agentes quelantes que eliminan metales de transición como el hierro y moléculas antioxidantes como el colesterol o ciertas vitaminas. En la Figura 1.5 se muestran los principales procesos bioquímicos generadores de ROS dentro de la célula, así como los más importantes sistemas antioxidantes. En las CE, la principal fuente de producción de ROS y concretamente de $O_2^{\cdot-}$ no corresponde a la cadena respiratoria mitocondrial, sino a los complejos enzimáticos NADPH oxidasas localizados en las membranas celulares¹⁰⁹⁻¹¹³. El $O_2^{\cdot-}$ es una especie de vida media muy corta (del orden de μs) que, aunque no es un potente oxidante, por su naturaleza inestable interacciona con otras moléculas y estructuras celulares. No puede por si mismo atravesar membranas biológicas pero si usar canales de membrana y que por acción de las SOD se transforma en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), una ROS mucho más estable que el $O_2^{\cdot-}$ y soluble en lípidos. Otra molécula muy importante para el endotelio es el peroxinitrito ($ONOO^-$), un potente oxidante formado a partir del NO y el $O_2^{\cdot-}$ y que se ha relacionado con trastornos vasculares, enfermedades cardíacas, neurodegenerativas, diabetes y cáncer¹¹⁴.

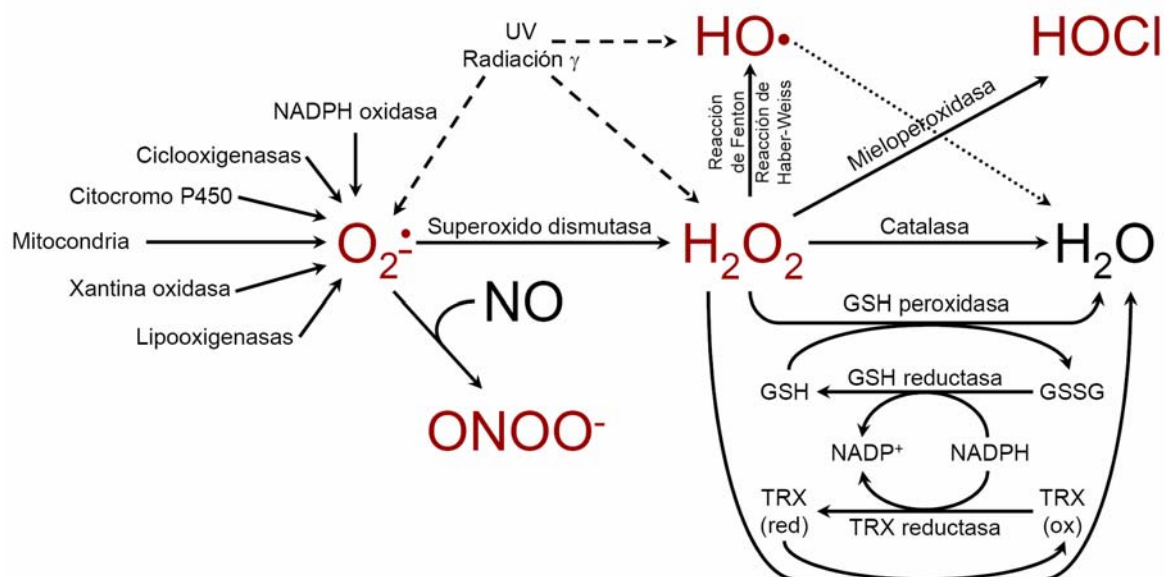


Figura 1.5: Reacciones químicas y enzimáticas generadoras de ROS y principales sistemas antioxidantes presentes en casi todas las células eucariotas. El oxígeno molecular (O_2) a través de sucesivas ganancias de electrones y protones puede transformarse en radical aniónico superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^{\bullet}). La formación de ROS pueden deberse a la propia actividad enzimática de la célula, a reacciones químicas o a efectos de la radiación. La superóxido dismutasa transforma el $O_2^{\bullet-}$ en O_2 y H_2O_2 y la catalasa desdobla el H_2O_2 en O_2 y H_2O . El ácido hipocloroso (HOCl) es producido por la mieloperoxidasa en neutrófilos activados. El $O_2^{\bullet-}$ puede interaccionar con el óxido nítrico (NO) y formar peroxinitrito ($ONOO^-$). Por otro lado, existen sistemas enzimáticos celulares como son el glutatión (GSH) y la tioredoxina reducida (TRX red), que actúan sobre el H_2O_2 y otros sustratos oxidados (a través de la GSH peroxidasa en el caso del GSH). Las formas oxidada del GSH (GSSG) y TRX (TRX ox) pueden ser reducida de nuevo a GSH y TRX red a través de la GSH y TRX reductasas respectivamente y usando NADPH. Esquema adaptado a partir de la figura 1 de Kamata et al Cell Signal 1999;11(1):1-14¹¹⁵.

El complejo enzimático de la NADPH oxidasa

El complejo enzimático de la NADPH oxidasa está formado por dos proteínas de membrana, gp91^{phox} o Nox2 y p22^{phox}, y un grupo de proteínas citoplasmáticas que actúan como subunidades reguladoras; p67^{phox}, p47^{phox}, p40^{phox} y una GTPasa; Rac, una proteína G de las denominadas “pequeñas”, y que puede ser Rac1 o Rac2 (Figura 1.6)¹¹⁶. Estas proteínas fueron descritas en neutrófilos (“phox” proviene de las iniciales *phagocyte oxidase*, oxidasa de fagocito), que utilizan las ROS como ataque químico contra patógenos, pero posteriormente se localizaron en otros tipos celulares como la propia CE^{117,118}. En el caso de las CE, gp91^{phox} también puede ser sustituido por Nox1 y Nox4¹¹⁹. Cuando se produce la señal de activación del complejo, las subunidades citoplasmáticas se unen a gp91^{phox}/p22^{phox} constituyendo una cadena de transporte electrónico capaz de transferir un electrón desde una molécula de NADPH a otra de O_2 ; como resultado se forma una molécula de $O_2^{\bullet-}$. Sin embargo, hay dos diferencias fundamental entre los complejos enzimáticos de la NADPH oxidasa de las CE con respecto a los presentes en neutrófilos. Primero, las CE poseen gran parte de los complejos preensamblados presentando un grado bajo de activación permanente, mientras que en el caso de los neutrófilos, los complejos están inactivos hasta que reciben la señal de activación. Segundo, en las CE los

complejos se localizan intracelularmente de modo que la producción de ROS está dirigida hacia el interior celular ¹²⁰ y no hacia el medio extracelular como en el caso de los neutrófilos donde los complejos se localizan en la cara exterior de las membranas. Estas dos diferencias son suficientes para entender como un mismo sistema generador de ROS puede servir a distintos tipos celulares para alcanzar objetivos muy diversos. El neutrófilo utiliza la sobreproducción de ROS para atacar patógenos invasores del organismo, mientras que la CE aprovecha esa producción como mecanismo de señalización celular.

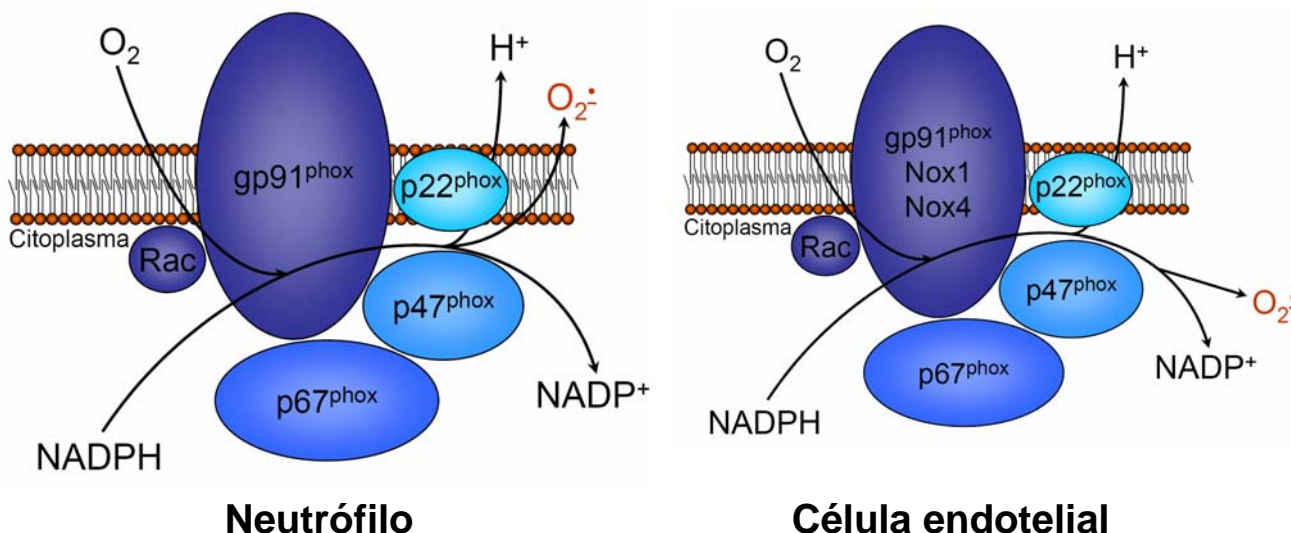


Figura 1.6: Principales componentes del complejo multienzimático de la NADPH oxidasa en el neutrófilo y en la CE. En el caso de las CE, gp91^{phox} también puede ser sustituido por Nox1 y Nox4 ¹¹⁹. Esquema adaptado a partir de la figura 1 de Griendling et al *Circ Res* 2000; 86(5):494-501 ¹²¹.

El estado redox celular

El conjunto de ROS presente en la célula; qué especies están presentes y a qué concentración, es lo que se conoce como “estado redox”, y el denominado “estrés oxidativo” ocurre cuando se produce una variación en dicho sistema redox, aunque siempre hace referencia a un incremento de al menos una especie en concreto. El desequilibrio en la homeostasis del sistema redox puede deberse a una sobreproducción de ROS por cualquiera de los mecanismos mostrados en la Figura 1.5 o por una deficiencia en los sistemas antioxidantes. Si este desequilibrio es importante, las ROS pueden inducir muerte celular por activación de la apoptosis ^{122,123} o incluso, si se trata de un desajuste masivo, por necrosis ^{124,125}. Sin embargo, si el desequilibrio no alcanza un nivel potencialmente letal, el estrés oxidativo produce variaciones en la fisiología celular al actuar sobre las vías de transducción de señales ¹²⁶⁻¹³⁰. En estos casos, las ROS llegan a comportarse como auténticos segundos mensajeros intracelulares ^{108,131,132}. Por citar algunos ejemplos clásicos, el H₂O₂ y el O₂^{•-} promueven el crecimiento de células musculares lisas vasculares activando las MAPKs p38 y p42/44 ¹³³, JNK y nuevamente p38 MAPK son activadas por el H₂O₂ producido en el tejido cardíaco tras sufrir isquemia/reperfusión ¹³⁴. Akt, una importante quinasa implicada en la supervivencia celular, es activada por H₂O₂ ¹³⁵. La PKC ¹³⁶, tirosinas fosfatasa ^{137,138} y hasta la señalización por Ca²⁺ ¹³⁹ se ven también afectadas por variaciones en el estado redox celular.

VEGF, ROS y HIF-1

Aunque es la concentración de oxígeno la principal responsable de la regulación de la expresión del VEGF ^{140,141} a través de HIF-1, existen numerosos factores de crecimiento (EGF, IGF-1, TGF α y β , PDGF y FGF) ¹⁴²⁻¹⁴⁴, citoquinas (IL-1 α y IL-6) ^{145,146} y hormonas (TSH, ACTH) ^{147,148} que también producen incrementos en los niveles de expresión del VEGF. Y lo más interesante de estos factores solubles es que en muchos casos está descrita su capacidad para incrementar los niveles del propio HIF-1, el principal regulador del VEGF. Efectivamente, la mayoría de los trabajos que relacionan los incrementos en la expresión del VEGF por factores solubles también describen una activación necesaria y previa de HIF-1 ¹⁴⁹⁻¹⁵³.

Por otro lado, con respecto a una relación entre ROS y VEGF, podemos asegurar que existe y que es recíproca. Es decir, variaciones en los niveles de ROS intracelulares modifican la expresión del VEGF y el propio VEGF por su parte altera el nivel de ROS tras unirse a sus receptores ^{112,154,155}. Lo que ya es más discutido es la relación entre ROS y HIF-1. En la literatura podemos encontrar trabajos que aportan resultados muy distintos atendiendo al tipo celular o modelo estudiado, a la fuente de las ROS (mitocondrial, sistemas de membrana o fuentes exógenas) o a las condiciones experimentales (concentración de oxígeno, confluencia del cultivo, baja disponibilidad de ATP, etc.) ¹⁵⁶⁻¹⁶¹. Sin embargo, podemos extraer dos conclusiones: 1) no siempre una variación de las ROS se traduce en una respuesta en los niveles de HIF-1, 2) el efecto de una ROS sobre los niveles de HIF-1 puede ser positivo o negativo en función de las condiciones fisiológicas en las que se encuentre la célula.

Con todo esto en mente, la posibilidad de que el VEGF, al igual que otros factores de crecimientos con receptores con actividad tirosina quinasa, al provocar cambios en el estado redox de la CE pueda ejercer algún efecto sobre su propio y principal regulador transcripcional, HIF-1, añadiría nueva información sobre como las ROS pueden actuar como intermediarios en los complejos mecanismos de señalización celular. Así mismo, si esta conexión VEGF-ROS-HIF-1 existe en la CE, el siguiente paso sería verificar la capacidad de ese HIF-1 activo y comprobar que efectos tiene sobre la CE. En esta tesis doctoral, usando como modelo experimental cultivos primarios de CE, confluentes y en normoxia, describiremos la capacidad del VEGF para producir incrementos en HIF-1, su principal regulador transcripcional, así como los mecanismo que intervienen en dicha inducción.

Implicaciones biológicas y fisiopatológicas de la acción de factores de crecimiento sobre HIF-1

A continuación, revisaremos someramente los posibles efectos de la activación de HIF-1 por efecto del VEGF u otros factores de crecimiento en distintas situaciones patológicas. La presente revisión no trata de ser exhaustiva con los efectos de HIF-1, pero intenta dar

una visión de conjunto de las circunstancias tan diversas en que este factor transcripcional se halla implicado y de las extraordinarias posibilidades terapéuticas que ofrecen su bloqueo o estimulación.

Patología tumoral

El rápido crecimiento de los tumores determina que su incremento de tamaño no se acompañe de un desarrollo vascular suficiente, lo que genera zonas de hipoxia en el interior de la masa tumoral. Esta hipoxia activa HIF-1 y éste a su vez pone en marcha toda la familia de genes angiogénicos importantes para el tumor entre los que se encuentra el VEGF ¹⁶². HIF-1 por tanto aumenta la densidad y permeabilidad vascular dentro de los tumores facilitando su crecimiento y posteriormente la temida metástasis; los vasos son la salida para las células cancerosa con capacidad para colonizar otros tejidos. Independientemente de la hipoxia, en algunos tumores, como hemangioblastomas y carcinomas renales, la activación de HIF-1 se relaciona con la inactivación funcional del gen supresor para pVHL, lo que disminuye la degradación y aumenta el HIF-1 total de la célula aun en normoxia ^{163,164}. Si bien el incremento de HIF-1 en los tumores es un hecho demostrado, no se han desarrollado aún muchos abordajes terapéuticos basados en su bloqueo específico ¹⁶⁵. Ahondando un poco más, se desconocen las causas de por qué, dentro de todos los genes dependientes de HIF-1, solo se expresan con mayor intensidad algunos, un fenómeno que debe estudiarse y que se relaciona con la presencia de sitios co-reguladores de los efectos de la unión del HIF-1 a los HRE.

Anemia y eritropoyesis

HIF-1 es esencial en la inducción fisiológica del gen de la EPO. Además, hay que destacar que HIF-1 actúa sobre al menos tres genes de importancia en cuanto al efecto de la EPO sobre el organismo: el de la transferrina, necesario para la oferta de hierro a las células eritroides, el del VEGF, cofactor en la estimulación de estas mismas células y el de la NOS2, necesario para la producción de NO y que permite el mantenimiento de cifras normales de presión arterial durante el efecto de la EPO. Este último efecto tiene tal grado de importancia que si en ratones transgénicos para la EPO humana es inhibida la NOS2 se llega a producir la muerte por complicaciones masivas cardiovasculares ¹⁶⁶. Como patología asociada, personas con mutaciones estimuladoras de HIF-1, como mutaciones del gen para pVHL, presentan policitemia familiar o eritrocitosis paraneoplásica ¹⁶⁷. De especial interés, la EPO no solo tiene funciones como regulador de la eritropoyesis, sino que participa en diferentes mecanismos, entre otros la vascularización retiniana y de la glándula mamaria, diferenciación de adipocitos, maduración embrionaria de la cresta neural, citoprotección neuronal, de miocardiocitos y de túbulos renales en situaciones de isquemia/repercusión ¹⁶⁸. En otro aspecto, el mecanismo exacto por el cual aumenta la EPO en la anemia humana no está satisfactoriamente descrito, y, por ejemplo, los pacientes de las Unidades de Cuidados Intensivos pueden tener niveles de EPO demasiado bajos para el grado de anemia que presentan; las razones no se conocen

suficientemente, y quizás estudios acerca del grado de actividad de HIF-1 en estos pacientes podría ayudar a entender este fenómeno ¹⁶⁹.

Enfermedad cardiaca

En la isquemia miocárdica se han detectado aumentos de VEGF relacionados con estimulación hipóxica ¹⁷⁰ y los niveles de VEGF en leucocitos expuestos a hipoxia se correlacionan con el grado de formación de colaterales que induce la isquemia coronaria *in vivo* ¹⁷¹. En este sentido, es de prever que los desarrollos terapéuticos se dirigirán progresivamente a drogas que aumenten la activación de HIF-1 o inhiban su degradación, como por ejemplo el PR39, un péptido derivado de los macrófagos que induce angiogénesis miocárdica ¹⁷². Un segundo aspecto de interés es el del papel de HIF-1 en el pre-condicionamiento cardíaco ante la isquemia, en el que tiene un papel relevante la síntesis de nuevas proteínas en las primeras 24 h que siguen a un episodio agudo, con particular referencia a la NOS2 en miocardiocitos y células endoteliales ¹⁷³. Por otro lado, la anemia es un factor patogénico relevante en la insuficiencia cardiaca y cuyo origen está aún discutido ¹⁷⁴. La presencia de niveles elevados de EPO en pacientes con insuficiencia cardiaca hace probable que HIF-1 esté previamente estimulado, pero no se dispone aún de datos publicados en este sentido.

Ictus

En modelos de oclusión vascular en ratas, se ha visto un incremento de la expresión de ARNm de HIF-1 en la zona de penumbra o tejido viable circundante al infarto ¹⁷⁵. Esto coincide con la expresión de ARNm de otros genes transactivados por HIF-1, como enzimas glucolíticas y VEGF, que promueven la supervivencia neuronal ¹⁷⁶. El desarrollo de fármacos que potencien la acción de HIF-1 podría significar una mejor recuperación del tejido afectado por el infarto o una disminución de la zona dañada.

Tabaco/Humo

Algunos de los mecanismos de carcinogénesis mediada por los hidrocarburos aromáticos policíclicos encontrados en el humo del tabaco y en la contaminación urbana, depende de su unión a AhR y su dimerización con ARNT, proteína que también dimeriza con HIF-1 α para constituir HIF-1 ⁶⁸. Por otra parte, la exposición al humo del tabaco reduce la angiogénesis inducida por hipoxia, disminuyendo la expresión de VEGF y HIF-1 α , a través de una desestabilización de HIF-1 α por el monóxido de carbono producido en la combustión del cigarrillo. Esta supresión de genes angiogénicos puede ser determinante en los efectos del tabaco sobre la microcirculación, habiéndose propuesto terapéuticas basadas en la administración de vectores portadores de VEGF ¹⁷⁷. Sin embargo, recientemente se ha descrito como el CO puede ejercer un efecto citoprotectivo al ser capaz de inducir rápidamente HIF-1 α en macrófagos ¹⁷⁸.

Preeclampsia y crecimiento intrauterino retardado

En la preeclampsia, existe un fallo primario del trofoblasto para invadir el miometrio e inducir la remodelación de las arterias espirales uterinas durante la placentación. Esto provoca una disminución de la perfusión de la placenta y una situación de hipoxia que activa HIF-1, promueve la expresión de TGF β 3 y la síntesis del sVEGFR1, el receptor soluble del VEGF ¹⁷⁹, que bloquea al VEGF y empeora la perfusión de la placenta. En este contexto, son posibilidades terapéuticas la inhibición de HIF-1/TGF β 3 con oligonucleótidos antisentido, o la administración de VEGF. Por otro lado, en el crecimiento intrauterino retardado existe una disminución de la perfusión placentaria e hipoxia que quizás explique el aumento de la proteína de unión al factor de crecimiento insulínico o IGFBP-1 (*insulin growth factor binding protein-1*) en sangre de cordón umbilical de neonatos con retraso de crecimiento ¹⁸⁰. El IGFBP-1, cuyo gen está regulado transcripcionalmente por HIF-1 de forma positiva, es un regulador negativo del propio factor de crecimiento insulínico, el IGF.

Patología retiniana

En modelos animales, se ha observado que la exposición a hiperoxia en el período neonatal, determina regresión vascular e isquemia, fenómenos similares a los descritos en la retinopatía de prematuros y que se relacionan con alteraciones de la expresión génica. Del mismo modo, se considera crucial el papel de factores como el VEGF en la neovascularización retiniana de la diabetes mellitus y otras retinopatías proliferativas ¹⁸¹⁻¹⁸³. Este es uno de los campos en los que el progreso terapéutico puede ser más acelerado, ya sea mediante incremento o inhibición de HIF-1 y genes dependientes.

Heridas

El VEGF aumenta localmente durante la curación de heridas involucrando un mecanismo mediado por ROS ¹⁸⁴. En este contexto, la sobreactivación de la vía de HIF-1 puede ser útil para incrementar la vascularización, permeabilidad vascular y cicatrización en heridas donde el VEGF no haya aumentado suficientemente.



2. Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral consiste en aportar nuevos datos sobre el modo en el que el VEGF ejerce su acción sobre cultivos de células endoteliales en confluencia y en condiciones no hipoxicas. A continuación, se enumeran y detallan los principales objetivos planteados a lo largo de la tesis.

1. Investigar el efecto que ejerce el VEGF y la eritropoyetina sobre el factor de transcripción HIF-1. Concretamente, estudiaremos la influencia de estos factores de crecimiento sobre los niveles de la subunidad α de HIF-1.
2. Evaluar el incremento de ROS producido por el VEGF y determinar que ROS intervienen en la inducción de HIF-1 α .
3. Estudiar qué fuente intracelular generadora de ROS media en el efecto del VEGF sobre HIF-1 α .
4. Estudiar qué rutas de señalización participan en los incrementos de HIF-1 α observados.
5. Determinar si el modo en que el VEGF aumenta los niveles de HIF-1 α consiste en disminuir su tasa de degradación, en incrementar su síntesis o a una combinación de ambos fenómenos.
6. Verificar la capacidad del VEGF para incrementar la expresión de su propio gen.



3. Materiales y métodos

Cultivos Celulares

Obtención y cultivo primario de células endoteliales de aorta bovina

Las células endoteliales de aorta bovina o BAEC (*bovine aortic endothelial cell*) fueron las CE empleadas en la mayoría de los experimentos. Se aislaron a partir de fragmentos de aorta (10-15 cm de longitud) donados por los mataderos de Gypisa (Pozuelo de Alarcón, Madrid) y Nombela (Coslada, Madrid). El método de obtención y cultivo es una modificación del protocolo descrito por Jaffe y col ¹⁸⁵. Brevemente, las aortas se recogieron en DPBS suplementado con antibióticos y una vez en el laboratorio, y en condiciones de esterilidad, las aortas se limpiaron de tejido conectivo, se ligaron con hilo los vasos secundarios para evitar la salida de líquido del interior de la aorta y se lavaron por dentro con DPBS para eliminar coágulos y restos de sangre. A continuación, cada fragmento de aorta se rellenó con DPBS que llevaba disuelto colagenasa tipo II taponando los dos extremos con pinzas quirúrgicas y se incubaron a 37 °C durante 20 minutos. La colagenasa tipo II rompe la red de colágeno de la matriz basal provocando la liberación del endotelio, la capa superficial interna del vaso que está constituido exclusivamente por CE. Para detener la actividad de la colagenasa, se añade RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino o FBS (*foetal bovine serum*). Seguidamente, se recogió todo el volumen contenido en cada aorta y se centrifugó a 1800 rpm durante 10 minutos. Tras descartar el sobrenadante, los pellets de células se resuspendieron y homogenizaron en RPMI-1640 suplementado con antibióticos, Glutamax (una fuente de L-glutamina) y FBS. Finalmente, los volúmenes de medio con las células en suspensión se repartieron en frascos de cultivo. Las células obtenidas se cultivaron en incubador con ambiente controlado; 37° C, 5% de CO₂ y humidificado. Una vez que las CE llegan a confluencia, se tripsinizan y se resiembran para ampliar el cultivo. Después de este primer pase, se emplea un medio selectivo para CE: MEM D-valina, suplementado con antibióticos, Glutamax y suero adulto bovino o DCS (*Donor Calf Serum*). La D-valina es el esteroisómero de la L-valina, un aminoácido esencial y que solo la célula endotelial puede metabolizar en ambas formas. De este modo, el medio selecciona a las CE frente a otras células contaminantes que hayamos arrastrado durante la digestión con la colagenasa como pueden ser los fibroblastos. Los cultivos de CE se usaron entre los pases 2 y 5 para los diferentes experimentos. Las células se caracterizaron como endoteliales por su fenotipo característico y la apariencia en "pavimento", crecimiento en monocapa y tinción para factor VIII. Con anterioridad, el Laboratorio realizó una caracterización exhaustiva de estas células incluyendo tinciones para filamentos intermedios específicos del endotelio (desmina y vimentina) y F-actina.

Obtención y cultivo primario de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano

Las CE de vena de cordón umbilical humano o HUVEC (*human umbilical vein endothelial cells*) fueron obtenidas a partir de cordones donados para investigación, previa firma de un documento de conocimiento informado, y provenientes del servicio de obstetricia de la Fundación Jiménez Díaz-Capio. Los cordones se recogieron en un

recipiente estéril inmediatamente después del parto y llevados en frío hasta el laboratorio. Una vez en condiciones de esterilidad, se eliminaron los restos de sangre ayudados de gasas estériles y se canularon por la vena principal. La cánula se fijó al cordón con pinzas quirúrgicas y se le incorporó un grifo. A través de la cánula, cada cordón se lavó 2 veces con suero salino. Después del lavado, cada cordón se cerró por el extremo contrario a la cánula con la ayuda de una pinza fija, se rellenó de medio M199 que llevaba disuelto colagenasa tipo II, se cierra el grifo de la cánula y se incubó a 37 °C durante 20 minutos. Para recoger las células desprendidas por la colagenasa, se cortaron los cordones por encima de la pinza fija y, ayudándose de una jeringa acoplada al grifo de la cánula, se hizo presión introduciendo medio M199 suplementado con FBS para inactivar la colagenasa. El medio del interior de cada cordón se recogió en recipientes estériles y seguidamente se centrifugó para precipitar las células. Los sobrenadantes se descartaron y los pellets de células se resuspendieron con medio M199 suplementado con antibióticos, FBS, un suplemento comercial para el crecimiento de CE denominado ECGS (*endothelial cell growth supplement*), fluconazol (un antifúngico de baja toxicidad celular) y heparina (impide la coagulación de los restos de sangre que se obtienen de los cordones tras la incubación con la colagenasa). Después del primer pase con tripsina, estos dejan de añadirse al M199.

Protocolo experimental general

En todos los experimentos, los cultivos de CE se encuentran en confluencia para reproducir las condiciones del endotelio en situación fisiológica normal dentro de los organismos. De modo general, al alcanzarse la confluencia, el medio de crecimiento es sustituido por medio sin suero para provocar una parada del ciclo celular en todas las células del cultivo. En el caso de las BAEC, este medio consiste en MEM D-Valina suplementado con aminoácidos esenciales y Glutamax. Tras 24 horas de espera con el medio sin suero, se añaden los estímulos. En el caso de ensayos en presencia de inhibidores (Tabla 3.4), primero incorporamos estos al medio de depleción y tras 30 minutos de incubación añadimos los estímulos. En todos los casos los inhibidores no se retiran por sustitución del medio, sino que permanecen junto al estímulo correspondiente durante todo el experimento. En el caso de las HUVEC, el medio de experimentación lleva un 1% de FBS, los aminoácidos no esenciales y el Glutamax. El tiempo de espera en este caso fue de sólo 2 horas antes del experimento.

Plásmidos, oligonucleótidos antisentidos y método de transfección

Método de transfección transitoria en CE

Para llevar a cabo transfecciones transientes en CE hemos empleado el método basado en la molécula *FuGene*. Sembramos las BAEC a una densidad de 2×10^5 células/cm² el día antes de la transfección para asegurarnos una confluencia del 80%

aproximadamente. El protocolo de transfección seguido fue el indicado por el fabricante usando una relación ADN - *FuGene* de 1:3 respectivamente. Brevemente, se mezcla primeramente el *FuGene* con medio de cultivo sin suero y sin antibióticos y dejamos incubarlo durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA). Después, añadimos el ADN y tras esperar 45 minutos de incubación a TA, añadimos la mezcla sobre el medio de cultivo dejándolo caer gota a gota a la vez que mantenemos en agitación la placa de cultivo. Al alcanzar la confluencia (24-48 horas después), da comienzo el experimento. Para determinar la eficacia de las transfecciones cada experimento lleva un control transfectado con el vector pEGFP-N1 que expresa la GFP de modo constitutivo permitiendo visualizar las células transfectadas mediante microscopia de fluorescencia y contabilizarlas por citometría de flujo. De este modo, determinamos que la eficacia de transfección fue de más del 50% en todos los casos. Los plásmidos utilizados se obtuvieron a partir de transformaciones en bacterias *E. Coli*, cepa DH5 α de fenotipo competente, usando el kit comercial *Endofree Plasmid Maxi Kit*.

Vectores de expresión

Para inhibir la producción de O₂^{•-} dependiente de la Rac1-NADPH oxidasa, transfectamos las CE con un dominante negativo de Rac1 introducido en el vector comercial pcDNA3 y denominado como “pcDNA3-Rac1N17”. Este vector fue donado por el Dr. Alberto Muñoz del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid.

Plásmidos reporteros

Los ensayos con plásmidos reporteros nos sirvieron para estudiar la actividad del promotor del VEGF sobre la transcripción de la luciferasa. Esta construcción (VEGF-luc) fue donada por el Dr. Gregg L. Semenza de la Johns Hopkins University School of Medicine ¹⁸⁶ y contiene la secuencia promotora del gen para el VEGF comprendida entre los pares de bases -2274 al 379 con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Para el ensayo, cotransfectamos VEGF-luc o el vector vacío (pGL2-Basic) junto con el vector luciferasa “renilla” comercial pRL-CMV, que nos sirve para normalizar los valores de actividad de la luciferasa. Las cantidades para cada vector fueron 0,1 y 10 μ g/ml para pRL-CMV y VEGF-luc/pGL2-Basic respectivamente. La lisis celular y la obtención de los extractos celulares para medir la actividad de la luciferasa se realizó según el protocolo comercial del kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System*. Los resultados están expresados en unidades relativas de actividad de la luciferasa.

Oligonucleótidos antisentido

Esta técnica permite bloquear la traducción de un determinado ARNm mediante un oligonucleótido de cadena simple que al unirse al mensajero impide la interacción con el ribosoma. Este oligonucleótido se denomina “antisentido” y corresponde a la secuencia complementaria de la región cercana al inicio de la traducción del ARNm que queremos “neutralizar”. En nuestro caso, diseñamos antisentidos para p67^{phox}, uno de los

componentes del complejo enzimático de la NADPH oxidasa. Paralelamente, un oligonucleótido, denominado “sentido”, que no posee la capacidad de unirse a ningún ARNm y por tanto no ejerce efecto sobre la traducción, se uso como control interno de la técnica. Los oligonucleótidos se incubaron con el agente transfectante *FuGene* y según el protocolo descrito anteriormente. La concentración final de los oligonucleótidos en las placas de cultivo fue de 5 μ M. Las secuencias para cada oligonucleótido fueron:

antisentido: 5'-TTTTGGTGAAGGCCTTCTC-3'

sentido: 5'-GAGAAGGCCTTCACCAAAA -3'

Análisis proteico

Extracción de proteínas

Después de los distintos tratamientos, las CE se lavaron y se recogieron mediante raspado en 1 ml de PBS a 4 °C. Usamos distintos tampones de extracción según se necesitase separar fracciones celulares u obtener extractos totales. Para la extracción diferencial de proteínas citoplasmáticas y nucleares y su posterior estudio mediante técnicas de Western blot, empleamos el método descrito por Schreiber et al. ¹⁸⁷. Brevemente, las células raspadas y recogidas en PBS se centrifugaron con un pulso. Los precipitados se resuspendieron en el tampón de extracción de proteínas citoplasmáticas mediante vórtex. Tras incubación durante 10 minutos, se añadió Igepal a los extractos (concentración final de Igepal del 0,5 %) para garantizar la lisis total de las células y se centrifugaron inmediatamente a 14.000 rpm durante 5 minutos y a 4 °C. Los sobrenadantes, que contienen las proteínas citoplasmáticas, se guardaron a -80 °C mientras que los pellets resultantes se resuspendieron en tampón de extracción de proteínas nucleares y se incubaron durante 45 minutos en hielo. Las proteínas nucleares se obtuvieron en el sobrenadante resultante de una nueva centrifugación a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C y se guardaron a -80 °C. Por otro lado, para la extracción de proteínas fosforiladas, las células raspadas y recogidas en PBS se centrifugaron con un pulso y los precipitados se resuspendieron con el tampón de extracción de proteínas fosforiladas mediante vórtex. Tras incubación durante 10 minutos, los extractos se centrifugaron a 14.000 rpm durante 5 minutos y a 4 °C. Los sobrenadantes se guardaron a -80 °C. Tras la extracción, las proteínas se cuantificaron mediante el kit comercial *Coomassie Plus Protein Assay Reagent* (Pierce).

Western blot

Los extractos proteicos se calentaron en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos y en condiciones reductoras con 2-mercaptoetanol al 5%. A continuación, se separaron en geles de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a membrana de nitrocelulosa. El porcentaje de los geles depende del tamaño de las proteínas a estudiar y concretamente, para HIF-1 α se emplearon porcentajes entre un 6 a un 8,5% y un 10-12% para α -tubulina, β -actina, p-

38, p42/p44 y JNK. Las condiciones de transferencia fueron en todos los casos de 1 mA/cm² durante 90 minutos usando un sistema de transferencia semihúmedo. Tras la transferencia, las membranas se tiñen con rojo ponceau para comprobar la eficacia de la misma y a continuación se bloquean durante al menos 60 minutos a TA con TBT + 5% leche descremada en polvo o BSA según los requerimientos del protocolo de cada anticuerpo. Después, se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario y al día siguiente, tras tres lavados de 10 minutos, con el correspondiente anticuerpo secundario durante 60 minutos y a TA (Tabla 3.1). Tras tres lavados de 10 minutos, las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia (ECL). Para normalizar la cantidad de proteínas cargadas en los geles empleamos varios métodos. En el caso del estudio de proteínas fosforiladas, se analizó las formas constitutivas después de detectar las fosforiladas. Cuando se analizaron extractos totales y citoplasmáticos, la membranas se lavaron y rehibridaron para detectar la α -tubulina. La intensidad de las bandas se analizó mediante el programa informático ImageJ (NIH, Bethesda).

Proteína diana	kDa	Condiciones de incubación del Ac 1°	Ac 2° anti	Condiciones de incubación del Ac 2°	Casa Comercial del Ac 1°	Casa Comercial del Ac 2°
α -tubulina	50	1/2000 en TBT + 5% leche	ratón	1/6000 en TBT + 5% leche	Sigma-Aldrich	Amersham
Akt	60	1/1000 en TBT + 5% BSA	conejo	1/6000 en TBT + 5% leche	Cell Signaling	Sigma-Aldrich
Fosfo-Akt	60	1/1000 en TBT + 5% BSA	conejo	1/6000 en TBT + 5% leche	Cell Signaling	Sigma-Aldrich
HIF-1 α	120	1/250-1/1000 en TBT + 5% leche	ratón	1/6000 en TBT + 5% leche	Transduction Laboratories-BD	Amersham
JNK	54/46	1/1000 en TBT + 5% BSA	conejo	1/6000 en TBT + 5% leche	Cell Signaling	Sigma-Aldrich
Fosfo-JNK	54/46	1/2000 en TBT + 5% BSA	ratón	1/6000 en TBT + 5% leche	Cell Signaling	Amersham
p38	43	1/2000 en TBT + 5% leche	ratón	1/6000 en TBT + 5% leche	Cell Signaling	Amersham
Fosfo- p38	43	1/1000 en TBT + 5% BSA	conejo	1/6000 en TBT + 5% leche	Cell Signaling	Sigma-Aldrich
VEGF	45	1/2000 en TBT + 5% leche	ratón	1/6000 en TBT + 5% leche	R&D	Amersham

Tabla 3.1: Listado de anticuerpos empleados para Western blot. Se indica peso molecular de la proteína diana del anticuerpo primario, la casa comercial del anticuerpo primario y las condiciones de incubación tanto para el anticuerpo primario como para el secundario.

Ensayo de retardo de la movilidad electroforética

El ensayo de retardo de la movilidad electroforética o EMSA (*Electrophoretic mobility shift assay*) se desarrolló empleando proteínas nucleares (8 μ g) y un oligonucleótido consenso (ADNs, 0,5 ng) para NF- κ B marcado con [γ -³²P] dATP en tampón de unión de EMSA 1x, al que se incluyó Poly (dl-dC) como ADN competitivo. Tras la incubación, las muestras se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida al 6% en TBE 0,25x. Los geles se secaron y se expusieron a películas X-Omat durante 24 h a -80 °C. Para verificar la banda de NF- κ B, se realizaron ensayos de competición con anticuerpos

apara p50 y p65 El oligonucleótido consenso para NF- κ B es de origen comercial (Promega) y su secuencia es:

5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'
3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'

Análisis de la expresión génica

Extracción de ARN

Para extraer el ARN total de las células empleamos el kit comercial *Tripure Isolation Reagent* siguiendo las instrucciones del fabricante. Los tiempos de extracción fueron de 6, 12 y 24 horas tras los tratamientos basándonos en estudios previos.

RT-PCR

De cada muestra, retrotranscribimos 1 μ g del ARN total a ADNc mediante el kit comercial *High Capacity cDNA Rev. Transcriptase* usando un termociclador convencional. Seguidamente, 2 μ l de cada muestra de ADNc se amplificaron mediante el kit comercial *FastStart TaqMan* usando un *Real-Time PCR System* modelo 7500. Los datos los analizamos usando el programa informático *7500 System SDS Software v1.2b1c3* suministrado por el fabricante del sistema de RT-PCR. Cada muestra fue analizada por duplicado y el número de copias de cada gen se normalizó midiendo la expresión del gen para la β -actina. Los cebadores y sondas empleados se diseñaron a partir de las secuencias para los genes bovinos de β -actina (GI: 75832053), VEGF (GI: 163006) y HIF-1 α (GI: 5019611) que aparecen registrados en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>).

Microscopia confocal

Inmunofluorescencia

Crecimos las CE hasta confluencia en cámaras de cultivo tratadas con poli L-lisina para favorecer la unión al sustrato. Tras los distintos tratamientos, lavamos con PBS a 4 °C e inmediatamente fijamos las células con Merckofix durante 10 minutos. A continuación, lavamos 3 veces con TBS y permeabilizamos las células con TBS + 0,2 % Triton X-100 durante 10 minutos. Después de 3 lavados con TBS + 0,1% de Tritón X-100 (TBT), incubamos los portas durante 1 hora con tampón de bloqueo (TBT + 5 % *blocking reagent*). Posteriormente, se incubó durante 2 horas a 37 °C con el anticuerpo primario para VEGF diluido 1:500 en tampón de bloqueo. Después de otros 3 lavados con TBT, incubamos con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con FITC diluido 1:200 en tampón de bloqueo durante 2 horas a TA. Para la visualización de los núcleos, a continuación del anticuerpo secundario, incubamos las CE con ioduro de propidio (IP; 0,05 μ g/ml) diluido en

TBT durante 30 minutos a TA. Las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron con un microscopio confocal modelo TCS SP20.

Detección de la producción de ROS mediante dihidrorodamina 123

La dihidrorodamina 123 es una molécula permeable a la membrana celular; una vez en el citoplasma, reacciona con las ROS oxidándose a rodamina, que es fluorescente ¹⁸⁸. Por tanto, la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la actividad de ROS intracelular. Al igual que para las inmunofluorescencias, las CE se dejaron crecer hasta confluencia en cámaras de cultivo tratadas con poli L-lisina donde se sometieron a los distintos tratamientos (VEGF 40 ng/ml durante 1 hora). La dihidrorodamina 123 (10 μ M) se incubó durante los últimos 15 minutos del experimento. Las CE se lavaron dos veces con PBS frío y se fijaron con Merckofix. Las imágenes de microscopía confocal se obtuvieron con un microscopio confocal modelo TCS SP20 (λ excitación: 485 nm; λ emisión: 530 nm). Para la comparación entre distintos tratamientos, todas las imágenes se tomaron empleando idénticas condiciones de exposición.

Detección de la producción de $O_2^{\cdot -}$ mediante dihidroetidina

La dihidroetidina es una molécula permeable a la membrana celular con capacidad para interaccionar el $O_2^{\cdot -}$ que la célula produce ^{189,190}. Como resultado se oxida formando etidina que interacciona intercalándose con el ADN de la célula y quedando atrapada en el interior celular. Es en este modo cuando podemos detectar la etidina formada mediante técnicas fluorescentes (λ excitación: 540 nm; λ emisión: 610 nm) y por tanto, la intensidad de la fluorescencia será proporcional a la cantidad de $O_2^{\cdot -}$ producida por la célula. Al igual que para las inmunofluorescencias, las CE se dejaron crecer hasta confluencia en cámaras de cultivo tratadas con poli L-lisina. Antes de someter a las CE a los distintos tratamientos, se incorpora la dihidroetidina (10 μ M) al medio de depleción y se incuba 30 minutos. Tras 60 minutos de estímulo, las CE se lavan dos veces con PBS de células y se fijan con Merckofix. Se tomaron imágenes con un microscopio de fluorescencia. Para la comparación entre distintos tratamientos, todas las imágenes se tomaron empleando idénticas condiciones de exposición.

Detección de la producción de $O_2^{\cdot -}$ por fluorimetría

Nuevamente usamos la dihidroetidina, pero en esta ocasión la CE se dejaron crecer en placas de cultivo de 6 pocillos. Al igual que para obtener imágenes al microscopio, la dihidroetidina se incorpora al medio de depleción y se incuba durante 30 minutos. Después de la incubación se añaden los estímulos. La detección de la etidina por fluorimetría la realizamos mediante un fluorímetro Infinite F200 a distintos tiempos. El análisis de los datos se llevó acabo mediante el programa informático i-Control v1.3 desarrollado por el fabricante del fluorímetro.

Estadística

Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar de la media. Excepto indicación específica, cada valor corresponde a un mínimo de 3 experimentos hechos por triplicado. Las comparaciones se hicieron mediante el test de ANOVA o la prueba de t de Student, emparejada o no emparejada. Se utilizaron los test de Fisher y Scheffé para comparaciones múltiples para determinar el nivel de significación p, que se consideró significativo a valores $< 0,05$. Las comparaciones entre cada condición de los experimentos y con el basal se hicieron con estos cálculos. Todos los cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 13.0 para Windows (SPSS Inc.).

Composición y uso de los medios de cultivo

RPMI-1640

De origen comercial, la composición completa del medio puede consultarse en la Web de Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>) bajo la referencia: 31870-025. Se empleó para la obtención de BAEC y solo hasta el primer pase. Los suplementos de este medio pueden verse en la Tabla 3.2.

MEM D-Valina

Es una modificación del MEM (*Minimun Essencial Medium*). La composición completa del medio puede consultarse en la Web de Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>), bajo la referencia: 22571021. En este medio, se ha sustituido el aminoácido valina, un aminoácido esencial, en su forma L por su isómero D. El MEM D-Valina se utilizó suplementado (Tabla 3.2) para el cultivo y mantenimiento de las BAEC o sin suero durante los experimentos realizados con estas células.

M199

De origen comercial, la composición completa del medio puede consultarse en la Web de Cambrex (<http://www.cambrex.com>) bajo la referencia: 12-118F. Se empleó para el crecimiento y mantenimiento de las HUVEC. Durante la obtención de las HUVEC se le incorpora colagenasa tipo II y ningún otro suplemento (Tabla 3.2).

Suplemento	Concentración	Presente en
Penicilina	100 U/ml	RPMI-1640, MEM D-val, M199
Estreptomicina	100 µg/ml	RPMI-1640, MEM D-val, M199
Glutamax	1x	RPMI-1640, MEM D-val, M199
Aminoácidos no esenciales	1x	RPMI-1640, MEM D-val, M199
Fluconazol	4 µg/ml	M199 (hasta el primer pase)
Heparina	8 µg/ml	M199 (hasta el primer pase)
ECGS	10 µg/ml	M199
Suero de ternera (DCS)	20%	MEM D-val
Suero fetal bovino (FBS)	10% - 20%	RPMI-1640 (10%), M199 (20%)
Colagenasa tipo II	0,5 mg/ml	M199 (solo obtención de HUVEC)

Tabla 3.2: Listado de los suplementos añadidos a los medios de cultivos y sus concentraciones de uso.

Composición y uso de soluciones tamponadas

DPBS

Composición: su nombre proviene del ingles *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline* y se compone de NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , KCl y glucosa (Tabla 3.3) a pH 7,4 y esterilizado por autoclave.

Uso:

1. Recogida de las aortas en el matadero: en este caso, se añaden los antibióticos penicilina, estreptomicina, fungizona y vancomicina (Tabla 3.3). Para evitar la perdida en la actividad de los antibióticos, (de todos ellos, la vancomicina una vez disuelta pierde su actividad en pocas horas) son añadidos en condiciones de esterilidad en el laboratorio antes de ir al matadero y con la solución atemperada a 4° C.
2. Lavado de aortas: sin añadir antibióticos. Se usa atemperado a 37° C.
3. Obtención de BAEC: sin añadir antibióticos. Al igual que en el lavado, en este caso se usa atemperado a 37° C pero se le añade Colagenasa tipo II (Tabla 3.3).

PBS

Composición: 8 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 , 2,7 mM KCl y 0,14 mM NaCl . pH 7,6.

Uso: para el lavado de células antes de fijarlas, lisarlas o levantarlas con tripsina-EDTA en el caso de células adherentes.

Componente	Concentración
NaH ₂ PO ₄	8 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,6 mM
Glucosa	5,6 mM
Penicilina	100 U/ml
Estreptomicina	100 µg/ml
Fungizona	0,67 µg/ml
Vancomicina	6,4 µg/ml
Colagenasa tipo II	0,5 mg/ml

Tabla 3.3: Componentes del DPBS y concentraciones de uso de la colagenasa tipo II y de los antibióticos añadidos.

Tripsina-EDTA

Composición: de origen comercial, la composición completa de esta solución puede consultarse en la Web de Invitrogen (<http://www.invitrogen.com>) referencia: 25200-072.

Uso: se emplea para desprender las células en cultivo con fenotipo adherente. La tripsina-EDTA elimina las uniones célula-célula y célula-matriz de modo que las células quedan suspendidas en el medio y puedan recogerse. La tripsina rompe las uniones de tipo peptídico entre los aminoácidos arginina y lisina. Por su parte, el EDTA secuestra los cationes de Ca²⁺ necesarios para algunas uniones celulares.

Tampón de unión de EMSA

Composición: 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM KCl, 1 mM EDTA, 4% glicerol, 0,25 mM MgCl₂, 0,125 mM ZnCl₂, 5 mM DTT.

Uso: es el tampón donde se incuban los extractos nucleares junto con los oligonucleótidos de secuencia específica para factores de transcripción.

TBS y TBT

Composición: 20 mM Tris-HCl y 137 mM NaCl a pH 7,6. Para preparar el TBT se añade 0,05% de Tween 20 al TBS.

Uso: es el tampón para lavados de las preparaciones de inmunofluorescencia y membranas de Western blot. Con el TBT se prepara las soluciones de bloqueo de ambas técnicas así como los tampones de incubación para anticuerpos.

Tampones de extracción de proteínas

Tampón de extracción de proteínas citosólicas

Composición: 10 mM Hepes, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 0,5 % Igepal, 0,5 mM PMSF, 3 mM DTT, 2,5 µg/ml aprotinina, 2,5 µg/ml pepstatina A y 2,5 µg/ml leupeptina a pH 7,6.

Uso: es el tampón con el que se lisa la membrana citoplasmática de las células y donde se recogen las proteínas solubles del compartimento citoplasmático. El tampón se prepara sin Igepal de modo que solo se añade al final del tiempo de incubación del tampón con las células. Inmediatamente después, las células se agitan mediante vórtex y el extracto se centrifuga. El sobrenadante contiene las proteínas citoplasmáticas y el pellet restos de membranas y los núcleos celulares ¹⁸⁷.

Tampón de extracción de proteínas nucleares

Composición: 20 mM Hepes, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5 mM PMSF, 3 mM DTT, 2,5 µg/ml aprotinina, 2,5 µg/ml pepstatina A y 2,5 µg/ml leupeptina a pH 7,6.

Uso: es el tampón con el que se lisa la membrana de los núcleos del pellet resultante de la lisis de las células con el tampón de extracción de proteínas citoplasmáticas. El pellet se resuspende en este tampón agitándose mediante vórtex. Tras 45 minutos de incubación, el extracto se centrifuga. El sobrenadante contiene las proteínas nucleares y el pellet los restos celulares insolubles ¹⁸⁷.

Tampón de extracción de proteínas fosforiladas

Composición: 50 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, 0,5% Igepal, 1 µg/ml pepstatina, 1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina, 20 mM NaF, 1 mM PMSF, 3 µM DTT y 2 mM Na₃VO₄ a pH 6,8.

Uso: es el tampón con el que se lisa las células y donde se recogen las proteínas solubles ¹⁹¹. El Na₃VO₄ y el NaF impiden que las proteínas pierdan sus residuos fosforilados.

Inhibidores y antioxidantes

Molécula	[final]	Acción sobre	Vehículo
Apocinina	1 mM	NADPH oxidasa	DMSO
Cicloheximida	10 µg/ml	síntesis proteica	DMSO
Dicumarol	20 µM	JNK	H ₂ O
L-NAME	400 nM	NOS	H ₂ O
MnTMPyP	25 µM	O ₂ ^{•-}	H ₂ O
PD98059	100 µM	p42/p44 MAPKs	DMSO
SB203580	20 µM	p38 MAPK	DMSO
Wortmanina	400 nM	PI3K	DMSO

Tabla 3.4: Listado de inhibidores usados así como su efecto sobre la célula, concentración de uso y vehículo.

Productos y casas comerciales

Reactivos

2-mercaptoetanol	Sigma-Aldrich
Acrilamida/bisacrilamida 29/1 (40%)	Sigma-Aldrich
Aminoácidos no esenciales	Invitrogen
Apocinina	Calbiochem
Aprotinina	Sigma-Aldrich
BSA	Sigma-Aldrich
Blocking Reagent	Roche
CaCl ₂	Sigma-Aldrich
Cicloheximida	Sigma-Aldrich
CoCl ₂	Sigma-Aldrich
Colagenasa tipo II	Sigma-Aldrich
DCS	Invitrogen
Dicumarol	Sigma-Aldrich
Dihidrorodamina 123	Molecular Probes
Dihidroetidina	Calbiochem
DMSO	Sigma-Aldrich
DTT	Sigma-Aldrich
EDTA	Sigma-Aldrich
EGTA	Sigma-Aldrich
EPO (Eprex)	Janssen Cilag
Estreptomina	Laboratorios Normon
FBS	Invitrogen
Fluconazol	Laboratorios Normon
Glicerol	Sigma-Aldrich
Glucosa	Sigma-Aldrich

Glutamax	Invitrogen
[γ -32P]dATP	Amersham
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
Hipoxantina	Sigma-Aldrich
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich
KCl	Panreac
KH ₂ PO ₄	Merck
Leche desnatada en polvo	Nestle
Leupeptina	Sigma-Aldrich
L-NAME	Sigma-Aldrich
LY294002	Sigma-Aldrich
M199	Cambrex
Merckofix	Merck
MgCl ₂	Merck
MnTMPyP	Calbiochem
Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
NaF	Sigma-Aldrich
NaH ₂ PO ₄	Merck
NF- κ B (oligonucleótido consenso)	Promega
PD98059	Calbiochem
Penicilina	Laboratorios Normon
Pepstatina	Sigma-Aldrich
PIGF	R&D Systems
PMSF	Sigma-Aldrich
Poli L-lisina	Sigma-Aldrich
SB203085	Calbiochem
SDS	Sigma-Aldrich
Tripsina-EDTA	Invitrogen
Tris	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Merck
VEGFA (VEGFA ₁₆₅ recombinante humano)	R&D Systems
Wortmanina	Sigma-Aldrich
Xantina Oxidasa	Sigma-Aldrich

Kits comerciales e instrumentación

Coomassie Protein Assay Reagent Kit	Pierce
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega
ECL	Amersham
Endofree Plasmid Maxi Kit	Qiagen

3. Materiales y métodos

FastStart Tacman	Roche
Fluorímetro Infinite T200	Tecan
High Capacity cDNA Rev. Transcriptase	Applied Biosystem
Microscopio confocal TCS SP20	Leica
Real-Time PCR System 7500	Applied Biosystem
Tripure Isolation Reagent	Roche



4. Resultados

Regulación de la expresión de la proteína de HIF-1 α en células endoteliales

El VEGF incrementa los niveles de la proteína de HIF-1 α

Nuestro primer objetivo fue determinar si las BAEC producen un incremento en la proteína de HIF-1 α como respuesta al estímulo por VEGF, y empleando técnicas de Western blot. Del mismo modo, dado que HIF-1 es un factor de transcripción y ejerce su función en el núcleo celular, quisimos analizar si el posible incremento en la proteína de la subunidad α de HIF-1 conllevaba una translocación previa desde el citoplasma al núcleo. Como pudimos comprobar, efectivamente el VEGF es capaz de inducir un incremento en la cantidad de proteína de HIF-1 α y además inducir su translocación al núcleo de modo dependiente a su concentración (Figura 4.1). Tras 6 horas de estímulo, y con solo 10 ng/ml de VEGF, se detectaron incrementos en los niveles de la proteína de HIF-1 α que, salvo usando la mayor concentración, solo puede ser detectada en el extracto nuclear.

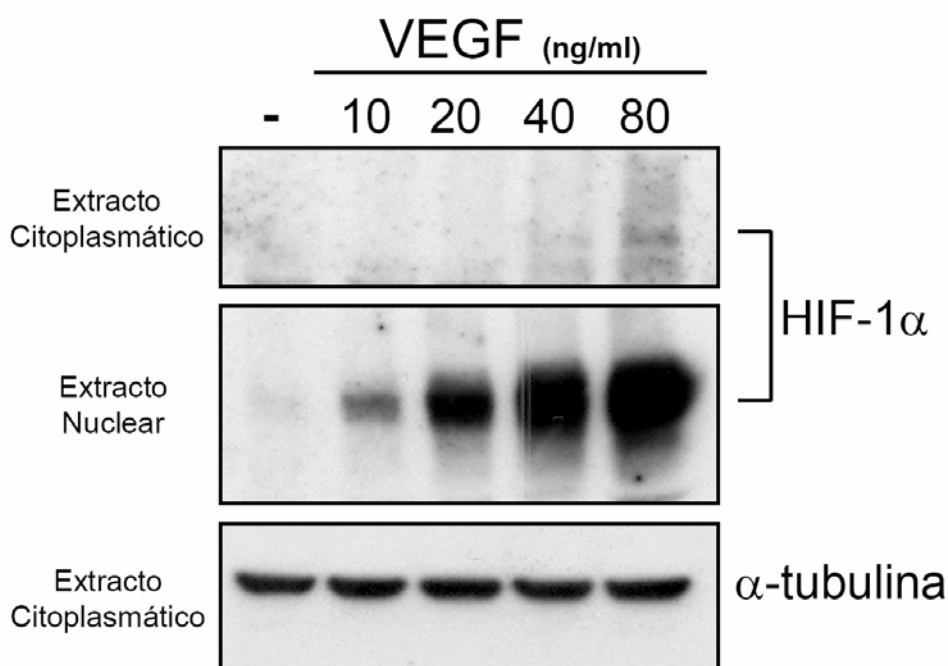


Figura 4.1: Western blot de HIF-1 α en BAEC estimuladas durante 6 horas con las concentraciones indicadas de VEGF. El primer carril (-) corresponde al basal de células sin estimular. La α -tubulina se usó como control de carga.

Por otro lado, el incremento en los niveles de HIF-1 α depende de la duración del estímulo (Figura 4.2), observándose una señal consistente desde las 3 y hasta las 12 horas con un nivel máximo a las 6 horas. Para este experimento usamos 40 ng/ml de VEGF.

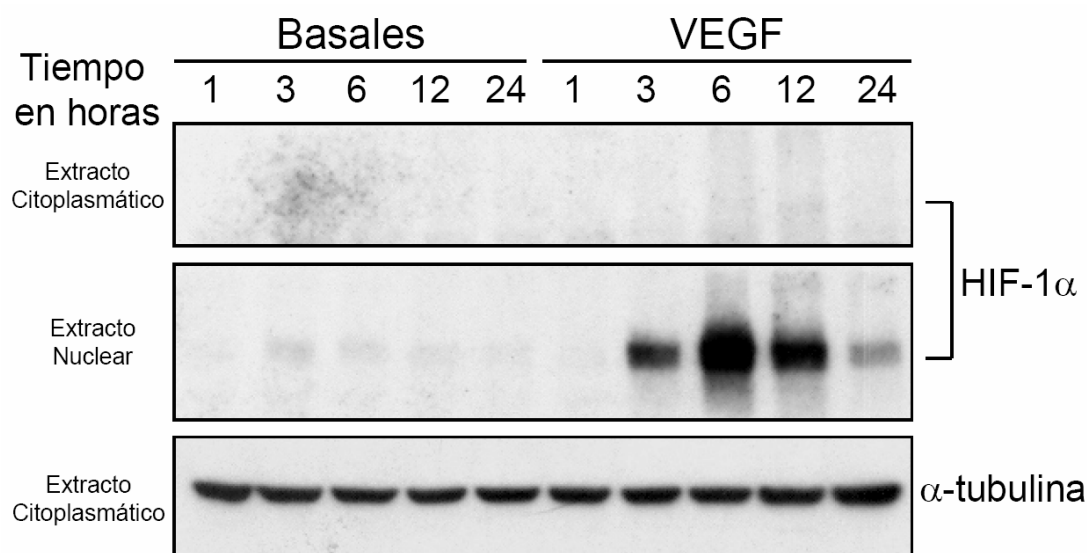


Figura 4.2: Western blot de HIF-1 α en BAEC estimuladas con 40 ng/ml de VEGF durante los tiempos indicados en horas. Los primeros 5 carriles corresponde a células en estado basal; no estimuladas con VEGF. La α -tubulina se usó como control de carga.

La capacidad del VEGF para incrementar los niveles de la proteína de HIF-1 α en BAEC nos hizo cuestionarnos si podríamos reproducir el mismo efecto usando otro tipo de CE, concretamente con HUVEC. Como puede verse en la [Figura 4.3](#), al igual que en BAEC se produce un incremento en los niveles nucleares de la proteína de HIF-1 α de modo concentración dependiente.

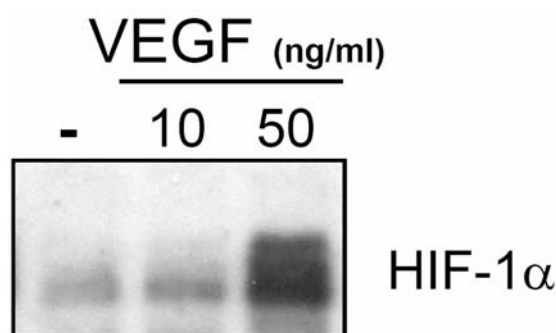


Figura 4.3: Western blot de HIF-1 α a partir de extractos nucleares de HUVEC estimuladas durante 6 horas con las concentraciones indicadas de VEGF. El primer carril (-) corresponde al basal de células sin estimular.

El PIGF incrementa los niveles de proteína de HIF-1 α pero no la EPO

Existen numerosos trabajos donde se recogen efectos similares al que estamos describiendo ^{149-152,192-194}, pero en otros tipos celulares. Antes de abordar con más detalle los mecanismos por los que el VEGF lleva a cabo su control sobre HIF-1 α , quisimos comprobar si algún otro factor de crecimiento, para los que la CE posea receptores, podía

producir un efecto similar al que describimos del VEGF. En primer lugar estimulamos BAEC durante 6 horas con concentraciones crecientes de EPO (Eprex, 50, 100 y 200 U/ml). El gen de la EPO, al igual que el del VEGF, está regulado principalmente por HIF-1, pero la EPO no puede unirse a los VEGFRs; señala a través de su propio receptor. Como puede verse en la [Figura 4.4](#), en este caso no detectamos efecto sobre los niveles de HIF-1 α a ninguna de las concentraciones de EPO utilizadas.

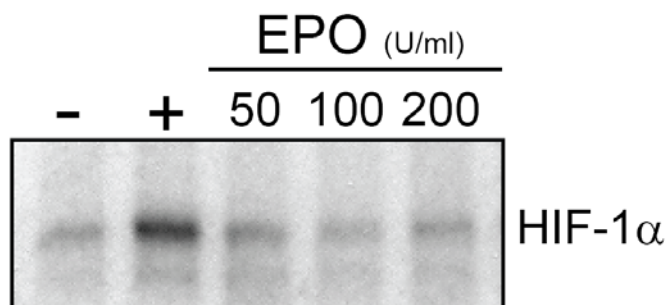


Figura 4.4: Western blot de HIF-1 α a partir de extractos nucleares de BAEC estimuladas durante 6 horas con las concentraciones indicadas de EPO (Eprex). El primer carril (-) corresponde al basal de células sin estimular mientras que el segundo (+) corresponde al control de células tratadas con 40 ng/ml de VEGF durante 6 horas con el que comparamos el efecto de la EPO.

El otro factor que usamos fue el PIGF (10, 20 y 40 ng/ml durante 6 horas), un factor de crecimiento que señala a través del VEGFR1 exclusivamente y no por ambos receptores del VEGF como si hace el VEGF-A₁₆₅. Como mostramos en la [Figura 4.5](#), al igual que el VEGF, el PIGF (40 ng/ml) también incrementó los niveles nucleares de proteína de HIF-1 α .

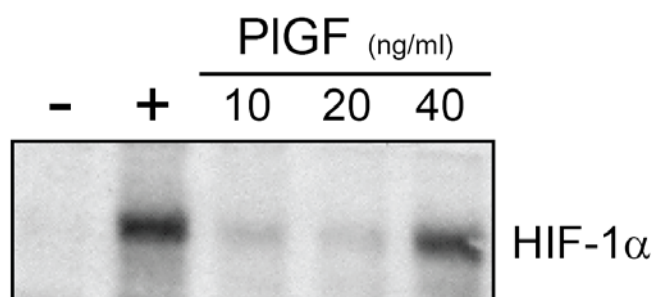


Figura 4.5: Western blot de HIF-1 α a partir de extractos nucleares de BAEC estimuladas durante 6 horas con las concentraciones indicadas de PIGF. El primer carril (-) corresponde al basal de células sin estimular mientras que el segundo (+) corresponde al control de células tratadas con 40 ng/ml de VEGF durante 6 horas con el que comparamos el efecto del PIGF.

El VEGF incrementa los niveles de ROS

Según estudios anteriores en CE el VEGF, puede incrementar los niveles intracelulares de ROS¹¹³. Dado que existen numerosos trabajos que relacionan variaciones

en el estado redox de la célula con fenómenos de activación e inhibición de HIF-1^{152,195,196}, nos cuestionamos la posibilidad de que los incrementos de HIF-1 α encontrados como respuesta al estímulo por VEGF pudieran deberse al menos en parte a un posible incremento de los niveles de ROS intracelulares. De este modo, primeramente comprobamos si se producía algún incremento en los niveles intracelulares de ROS en nuestras condiciones experimentales. Para ello utilizamos BAEC que, tras estimularlas durante 1 hora con 40 ng/ml de VEGF, marcamos con dihidrorodamina 123, una molécula sensible a ROS. Como se puede apreciar en la [Figura 4.6](#), el VEGF incrementa considerablemente los niveles de ROS intracelulares.

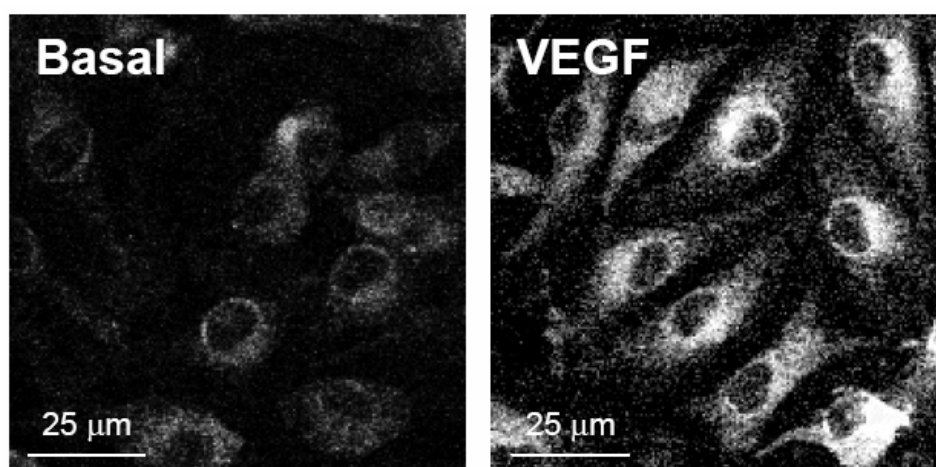


Figura 4.6: Microfotografías obtenidas por microscopía confocal de BAEC estimuladas durante 60 minutos con vehículo (Basal) o 40 ng/ml de VEGF e incubadas durante los 15 últimos minutos del experimento con dihidrorodamina 123, una molécula sensible a ROS.

No todas las ROS incrementan los niveles de proteína de HIF-1 α

Una vez confirmada la capacidad del VEGF para incrementar los niveles de ROS intracelulares en BAEC, quisimos averiguar si provocando un aumento similar mediante sistemas generadores de ROS podíamos encontrar un incremento en los niveles de proteína de HIF-1 α parecido al producido por el VEGF. Por otro lado, al disponer de generadores de distintos ROS, de paso podemos precisar con más detalle que tipo de ROS en particular es responsable del incremento de HIF-1 α . De este modo, estimulamos BAEC confluentes durante 6 horas (al igual que con VEGF) con concentraciones crecientes de H₂O₂ (2, 10, 50 y 250 µM) y un sistema exógeno generador de O₂^{•-}; HX (2 mM)/XO (0,5, 2,5, 5 y 12,5 mU/ml), y comparamos la cantidad de señal de HIF-1 α con un control estimulado con 40 ng/ml de VEGF durante 6 horas. Como puede verse en la [Figura 4.7](#), ninguna de las concentraciones usadas de H₂O₂ causó incremento alguno de HIF-1 α , al contrario de la XO que provocó un incremento proporcional a su concentración. Es importante resaltar que dado que el sustrato de la XO, la HX, se encuentra en una concentración saturante de 2 mM, la generación de O₂^{•-} mediante el sistema HX/XO depende exclusivamente de la concentración de XO.

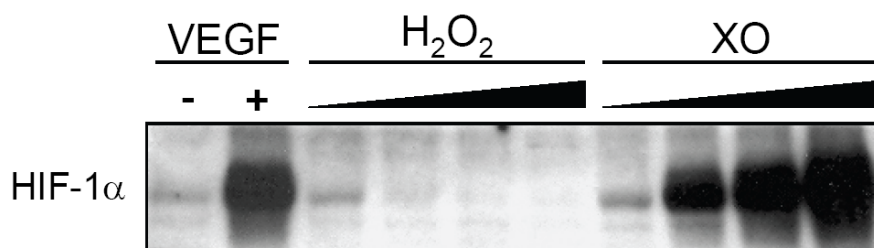
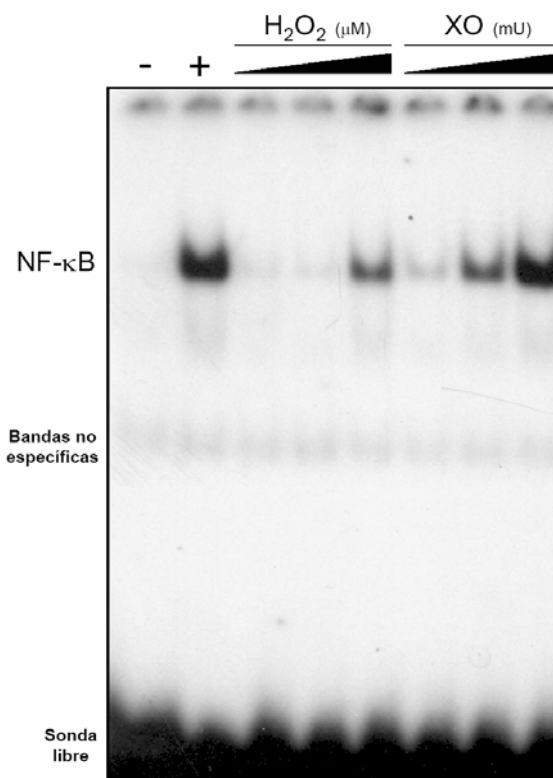


Figura 4.7: Western blot para HIF-1 α a partir de extractos nucleares de BAEC estimuladas durante 6 horas con concentraciones crecientes de H₂O₂ (2, 10, 50 y 250 μ M) o XO (0,5, 2,5, 5 y 12,5 mU/ml). Para todas las concentraciones de XO se utilizó una dosis de 2 mM de HX. El primer carril (-) corresponde al basal de células sin estimular mientras que el segundo (+) corresponde al control de células tratadas con 40 ng/ml de VEGF durante 6 horas con el que comparamos el efecto del H₂O₂ y la HX/XO.

Como la ausencia de incremento alguno por efecto del H₂O₂ no era esperada, ya que existe numerosos trabajos que recogen la relación entre esta ROS y HIF-1 α , quisimos verificar la validez de nuestro diseño experimental analizando el grado de activación de otro factor de transcripción, el NF- κ B. Este factor está ampliamente estudiado y de sobra es conocida la capacidad de distintas ROS para provocar su activación. Como puede verse en la Figura 4.8, ambas ROS (H₂O₂ y el O₂⁻ producido por el sistema HX/XO) así como el VEGF, activan de forma concentración dependiente a NF- κ B, indicándonos la validez de nuestro modelo oxidante.

Figura 4.8: EMSA para NF- κ B a partir de extractos nucleares de BAEC estimuladas durante 6 horas con concentraciones crecientes de H₂O₂ (10, 50 y 250 μ M) o XO (0,5, 2,5, 5 mU/ml). Para todas las concentraciones de XO se utilizó una dosis de 2 mM de HX. El primer carril (-) corresponde al basal de células sin estimular mientras que el segundo (+) corresponde al control de células tratadas con 40 ng/ml de VEGF durante 6 horas con el que comparamos el efecto del H₂O₂ y la HX/XO.



El VEGF incrementa los niveles intracelulares de O₂⁻

Hasta ahora, los resultados descritos son suficientes para afirmar que: 1) el VEGF es capaz de incrementar los niveles de HIF-1 α , 2) que el VEGF produce un aumento en los niveles de ROS de la CE y 3) que el O₂⁻ generado exógenamente por el sistema HX/XO

también induce los niveles de la proteína de HIF-1 α . Sin embargo, aún no podemos asegurar que el O₂^{•-} es un mediador de la acción del VEGF sobre HIF-1 α . De este modo, como primer paso quisimos comprobar la capacidad del VEGF para producir incrementos en los niveles de O₂^{•-}. Para ello, estimulamos BAEC, confluentes y marcadas previamente con dihidroetidina, con 40 ng/ml de VEGF o con 2,5 mU/ml de XO durante 1 hora. La dihidroetidina es una molécula sensible a la oxidación específica por O₂^{•-} que modifica su espectro de emisión de fluorescencia en el proceso oxidativo. Gracias a ello, podemos relacionar los aumentos en la fluorescencia de la dihidroetidina oxidada con incrementos en los niveles de O₂^{•-}. Como se aprecia en la [Figura 4.9](#), el VEGF es capaz de incrementar los niveles de O₂^{•-} al igual que 2,5 mU/ml de XO. Además, este incremento es eliminado por MnTMPyP (25 μ M), una molécula permeable por la membrana celular y que actúa como un antioxidante específico de O₂^{•-} al mimetizar el efecto de la superóxido dismutasa.

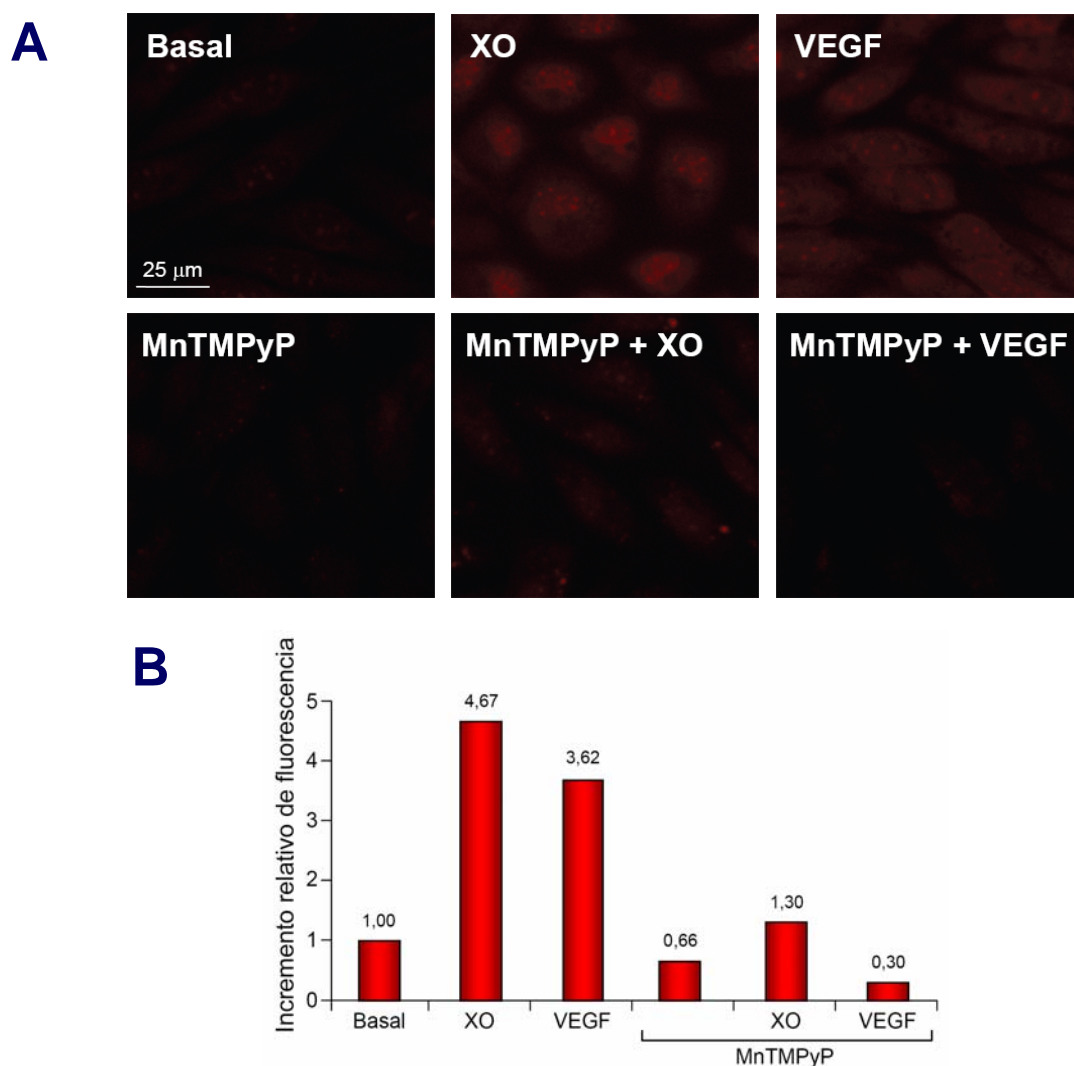


Figura 4.9: **A:** Microfotografías obtenidas por microscopía de fluorescencia de BAEC estimuladas durante 60 minutos con vehículo (Basal), 2,5 mU/ml de XO más 2 mM de HX ó 40 ng/ml de VEGF en presencia o ausencia de 25 μ M de MnTMPyP e incubadas previamente con dihidroetidina, una molécula sensible a la oxidación por O₂^{•-}. **B:** Representación del incremento relativo de la intensidad de fluorescencia tras densitometrar cada imagen y compararla con la señal del punto basal. Se asignó como valor “1” la señal de fluorescencia del basal.

Otra forma de analizar la producción de $O_2^{\cdot-}$ en BAEC mediante dihidroetidina consiste en medir la cantidad de fluorescencia emitida a distintos tiempos desde el momento de estimulación con VEGF por fluorimetría. La actividad celular produce constantemente ROS como el $O_2^{\cdot-}$ de modo que desde el momento en que se añade la dihidroetidina al medio y esta se va incorporando al interior celular, la fluorescencia emitida por la dihidroetidina oxidada aumenta continuamente. Si estudiamos la pendiente de las rectas resultantes de los valores de fluorescencia medidos a intervalos periódicos (la velocidad de producción $O_2^{\cdot-}$), podremos averiguar si en presencia de VEGF la cantidad de fluorescencia emitida, y en definitiva la cantidad de $O_2^{\cdot-}$, aumenta más rápido. Efectivamente, tal y como puede observarse en la [Figura 4.10](#), la pendiente de la recta correspondiente al tratamiento con 40 ng/ml de VEGF es mayor que el control basal, confirmándose el aumento de la producción de $O_2^{\cdot-}$ por VEGF en CE. Por otro lado, como era de esperar, en presencia de 25 μ M de MnTMPyP el $O_2^{\cdot-}$ que pueda producir el VEGF es eliminado y la cantidad de fluorescencia debida a la oxidación de la dihidroetidina permanece constante.

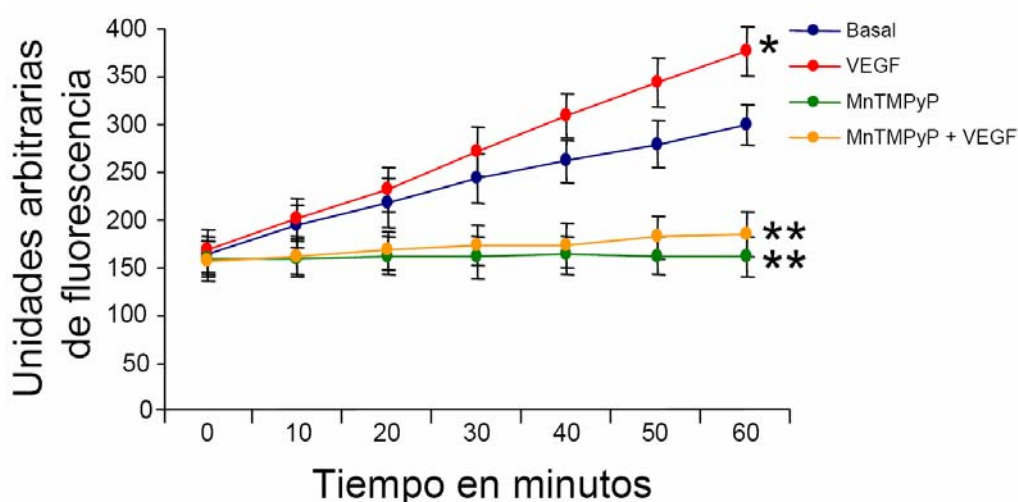


Figura 4.10: Medida de fluorescencia de la dihidroetidina oxidada en BAEC estimuladas a distintos tiempos con vehículo (Basal) o 40 ng/ml de VEGF y en presencia o no de MnTMPyP (25 μ M). * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ con respecto al basal.

La NADPH oxidasa y el $O_2^{\cdot-}$ como mediadores de la acción del VEGF sobre HIF-1 α

Una vez demostrada la capacidad del VEGF para incrementar los niveles intracelulares de $O_2^{\cdot-}$, nos preguntamos que mecanismo utiliza el VEGF para producir esta especie. Las NADPH oxidasas localizadas en la cara interna de la membrana celular constituye una de las principales fuentes de generación de $O_2^{\cdot-}$ en las CE ¹¹³ y, dada su localización, es razonable considerar una posible interacción con los receptores de VEGF ¹¹². Con los datos disponibles hasta ahora, sabemos que el VEGF y el $O_2^{\cdot-}$ son capaces de incrementar los niveles de la proteína para HIF-1 α en las CE, pero aun no podemos afirmar que sea el $O_2^{\cdot-}$ producido por el VEGF el responsable de dicho incremento. De este modo, diseñamos el siguiente experimento para comprobar si el VEGF necesita obligatoriamente al $O_2^{\cdot-}$ para ejercer su acción sobre la expresión de HIF-1 α y si los complejos de las NADPH oxidasas participan como el sistema generador de $O_2^{\cdot-}$. Como puede verse en la [Figura](#)

4.11, BAEC estimuladas con 40 ng/ml de VEGF durante 6 horas en presencia de apocinina (1 mM), un inhibidor específico del complejo de la NADPH oxidasa, así como de MnTMPyP (25 μ M), no eran capaces de incrementar los niveles nucleares de la proteína de HIF-1 α .

Por otro lado, dado que el VEGF induce la producción de NO, para detectar la posible influencia de los ONOO $^-$ proveniente de la interacción entre O $_2^{\cdot-}$ y NO, analizamos la influencia del VEGF o el O $_2^{\cdot-}$ sobre HIF-1 α en presencia de L-NAME, un inhibidor específico de la NOS. Como puede ver en la Figura 4.11, el L-NAME no tiene ningún efecto sobre la acción del VEGF, pero si cuando el estímulo proviene del sistema HX/XO.

Como conclusión, podemos afirmar que tanto el complejo de la NADPH oxidasa como el O $_2^{\cdot-}$ son mediadores de la señalización del VEGF sobre HIF-1 α sin que sea necesaria la mediación del ONOO $^-$. Del mismo modo, en las BAEC estimuladas con 2,5 mU/ml de XO en presencia de MnTMPyP tampoco se observó efecto alguno, demostrándose la capacidad del O $_2^{\cdot-}$ para incrementar la proteína de HIF-1 α por si mismo. Finalmente, comentar que, como era de esperar, el HIF-1 α inducido por el sistema HX/XO no es inhibido por la apocinina y si por el MnTMPyP; la apocinina es un inhibidor específico de las NADPH oxidasas, mientras que el MnTMPyP elimina el O $_2^{\cdot-}$ producido por cualquier fuente, ya sea exógena o propia de la CE.

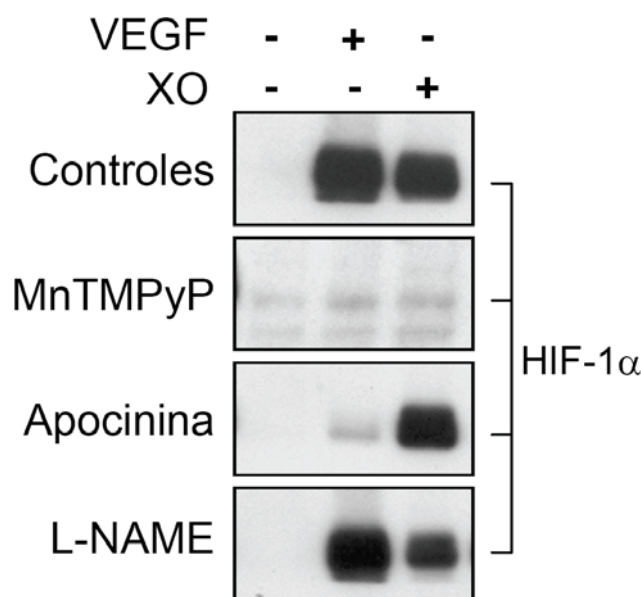


Figura 4.11: Western blot de HIF-1 α a partir de extractos nucleares de BAEC estimuladas durante 6 horas con 40 ng/ml de VEGF (carril central) ó 2,5 mU/ml de XO más 2 mM de HX (carril derecho) y en ausencia (Controles) o en presencia de 25 μ M MnTMPyP, 1 mM de apocinina ó 400 nM de L-NAME. Los símbolos (+) y (-) corresponden a presencia o ausencia del estímulo indicado respectivamente.

Para confirmar los resultados obtenidos con inhibidores farmacológicos, estudiamos el papel del complejo de la NADPH oxidasa mediante un abordaje distinto; transfectando BAEC con un dominante negativo, no funcional, de Rac1. Rac1 es una proteína G de las

denominadas pequeñas que forma parte del complejo enzimático de la NADPH oxidasa. De este modo, aquellas BAEC transfectadas con el dominante negativo para Rac1 poseen complejos NADPH oxidasa no funcionales y por tanto no serán capaces de producir $O_2^{\cdot-}$ como respuesta al estímulo con VEGF. Como puede verse en la [Figura 4.12](#), los efectos del VEGF sobre los niveles de HIF-1 α desaparecen en aquellas BAEC transfectadas con el dominante negativo de Rac1 implicando nuevamente al complejo de la NADPH oxidasa como mediador del VEGF.

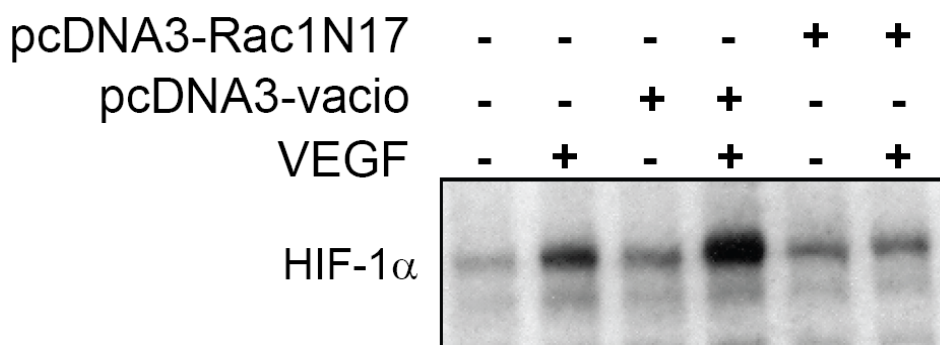
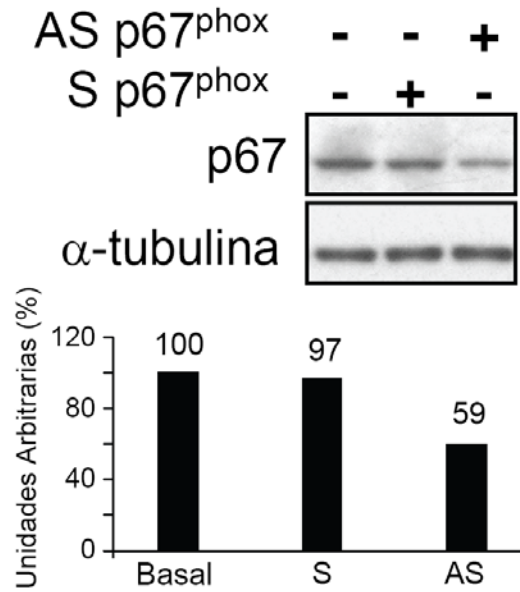


Figura 4.12: Western blot de HIF-1 α a partir de extractos nucleares de BAEC estimuladas durante 6 horas con 40 ng/ml de VEGF. pcDNA3-Rac1N17 y pcDNA3-vacio corresponden a los vectores portadores o no del gen para el dominante negativo de Rac1 respectivamente. Los símbolos (+) y (-) corresponden a presencia o ausencia del estímulo o vector indicado respectivamente.

Finalmente, y para confirmar los resultados obtenidos con la apocinina y el dominante negativo de Rac1, transfectamos BAEC con un oligonucleótido antisentido para el ARNm de p67^{phox}, otra de las proteínas integrantes del complejo de la NADPH oxidasa. Como podemos ver en la [Figura 4.13B](#), los efectos del VEGF sobre los niveles de HIF-1 α desaparecen en aquellas células tratadas con el oligonucleótido antisentido para p67^{phox} pero no en las tratadas con el sentido, que no posee la capacidad de bloquear la traducción y constituye el control interno de la técnica. Una inhibición del de p67^{phox} del 41% fue suficiente para bloquear la inducción de HIF-1 α por VEGF. Una vez más, encontramos a la NADPH oxidasa participando como mediador del efecto del VEGF sobre HIF-1 α .

A



B

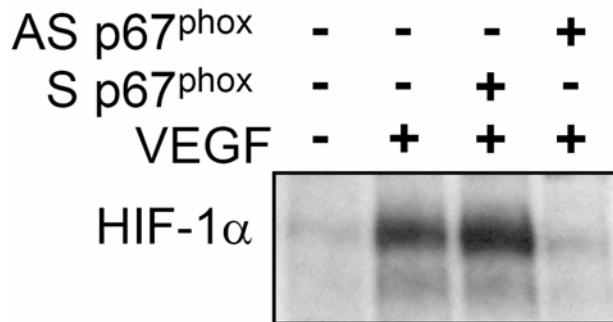


Figura 4.13: A: En la parte superior: Western blot de p67^{phox} a partir de extractos citoplasmáticos de BAEC incubadas durante 48 horas con los oligonucleótidos antisentido y sentido a una concentración de 5 μ M. La α -tubulina se usó como proteína constitutiva. En la parte inferior: densitometría de la inhibición de p67^{phox} mostrada en el Western blot anterior. Se asignó como valor del 100% a la señal del carril basal (doble signo -) tras corregir las diferencias con la señal de las α -tubulina. **B:** Western blot de HIF-1 α a partir de extractos nucleares de BAEC estimuladas durante 6 horas con 40 ng/ml de VEGF. AS p67^{phox} y S p67^{phox} corresponden a los oligonucleótidos antisentido y sentido, para el ARNm de p67^{phox} respectivamente y que se añadieron al medio en el momento de la depleción a una concentración de 5 μ M. En ambos apartados, los símbolos (+) y (-) corresponden a presencia o ausencia del estímulo o oligonucleótido indicado.

Rutas de señalización implicadas en la acción del VEGF y el $O_2^{\cdot-}$ sobre HIF-1 α

El VEGF a través de sus receptores específicos (VEGFR1 y 2) presentes en las CE induce gran número de respuestas biológicas¹⁹⁷. Estas respuestas son el resultado de la activación de gran número de rutas de señalización entre las cuales destacan la de la PI3K-Akt y la ruta de las MAPK p42/p44. Estas y otras rutas se tuvieron en cuenta a la hora de buscar aquellas involucradas en los incrementos de HIF-1 α descritos para el VEGF y el $O_2^{\cdot-}$. Para ello, previamente comprobamos distintas concentraciones de cada inhibidor y elegimos aquellas que sin dañar las células, tuviese un efecto inhibitorio claro.

En la [Figura 4.14](#) mostramos aquellas rutas que encontramos implicadas en los incrementos de HIF-1 α salvo el caso de las MAPK p42/44 que, sin ser necesarias para que el VEGF actúe sobre los niveles de HIF-1 α , consideramos importante mencionarlas. Como puede verse, los inhibidores para la ruta de JNK (dicumarol, 20 μ M), p38 (SB203580, 20 μ M) y PI3K (wortmanina, 400 nM) bloquearon total (dicumarol y SB203580) o parcialmente (wortmanina) la señal para HIF-1 α , indicando que dichas rutas son necesarias para que tanto el VEGF pueda inducir incrementos en los niveles de proteína de HIF-1 α . En presencia del inhibidor de las MAPK p42/44 (PD98059, 100 μ M), el VEGF y el $O_2^{\cdot-}$ siguen produciendo incrementos en los niveles de la proteína para HIF-1 α indicando que dicha ruta no participa en la regulación de HIF-1 por VEGF.

Sin embargo, estos resultados no demuestran concluyentemente que las rutas de la JNK, p38 y PI3K estén implicadas en la transducción de la señal del VEGF desde sus receptores hasta el control de la síntesis de HIF-1 α . Indican que estas quinasas son necesarias para la célula a la hora de producir incrementos en los niveles de HIF-1 α pero no que el VEGF señalice intracelularmente a través de ellas. En conclusión, JNK, p38 y PI3K-Akt son fuertes candidatas y nuestro siguiente objetivo de análisis experimental.

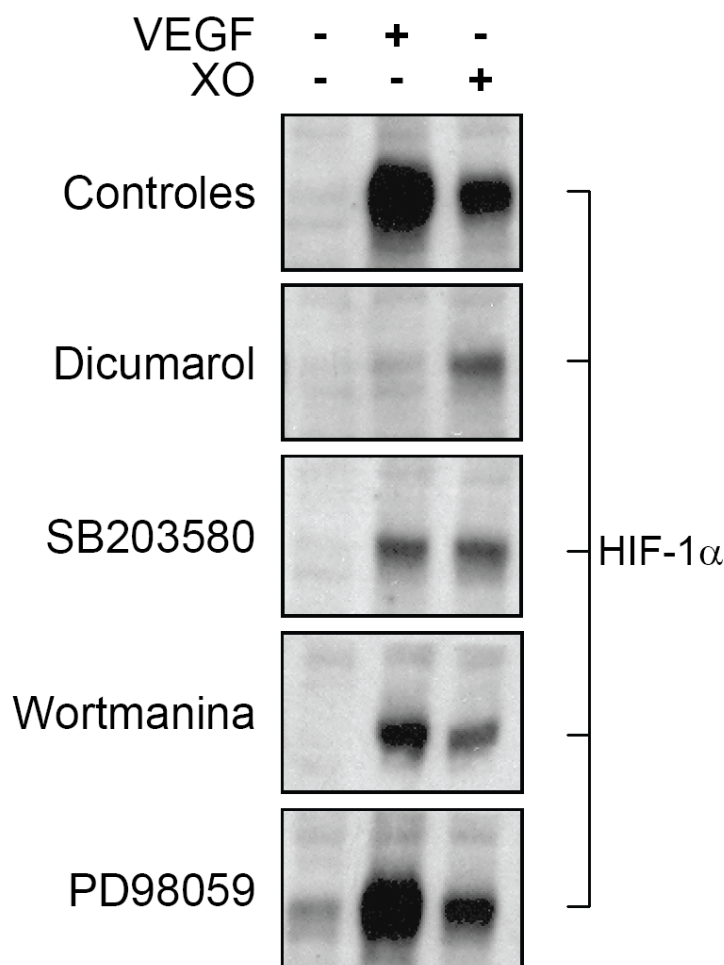


Figura 4.14: Western blot de HIF-1 α a partir de extractos nucleares de BAEC estimuladas durante 6 horas con 40 ng/ml de VEGF (carril central) ó 2,5 mU/ml de XO más 2 mM de HX (carril derecho) y en presencia o no de dicumarol (20 μ M, inhibidor de las JNK), SB203580 (20 μ M, inhibidor de p38 MAPK) wortmanina (400 nM, inhibidor de PI3K) o PD98059 (100 μ M, inhibidor de p42/44 MAPK). Los símbolos (+) y (-) corresponden a presencia o ausencia del estímulo indicado.

Una forma efectiva para comprobar si el VEGF emplea estas quinasas consiste en verificar si se fosforilan, lo que implicaría la activación de la ruta, tras añadir VEGF al medio de cultivo. Realizamos curvas de tiempo para la concentración de 40 ng/ml de VEGF e hicimos Western blot para las formas fosforiladas de JNK, p38 y Akt. Como muestra la [Figura 4.15](#), el VEGF en BAEC provoca la fosforilación de JNK y p38 a los 30 minutos pero no tiene efecto sobre el grado de fosforilación de Akt. Por otro lado, dado el alto grado de fosforilación de Akt en todos los puntos del experimento, quisimos averiguar cual era su estado de activación antes del estímulo con VEGF, y nos encontramos con que en todos los experimentos realizados, el grado de fosforilación fue muy similar al del resto de puntos de los experimentos anteriormente descritos. Este último resultado, junto con el que el ensayo con inhibidores muestre la necesidad de la quinasa PI3K para que el VEGF regule la expresión de HIF-1 α , nos indica que la ruta de la PI3K-Akt es necesaria para la CE a la

hora de cumplir sus funciones, pero que no necesita una potenciación de esta vía de señalización para variar los niveles de la proteína de HIF-1 α .

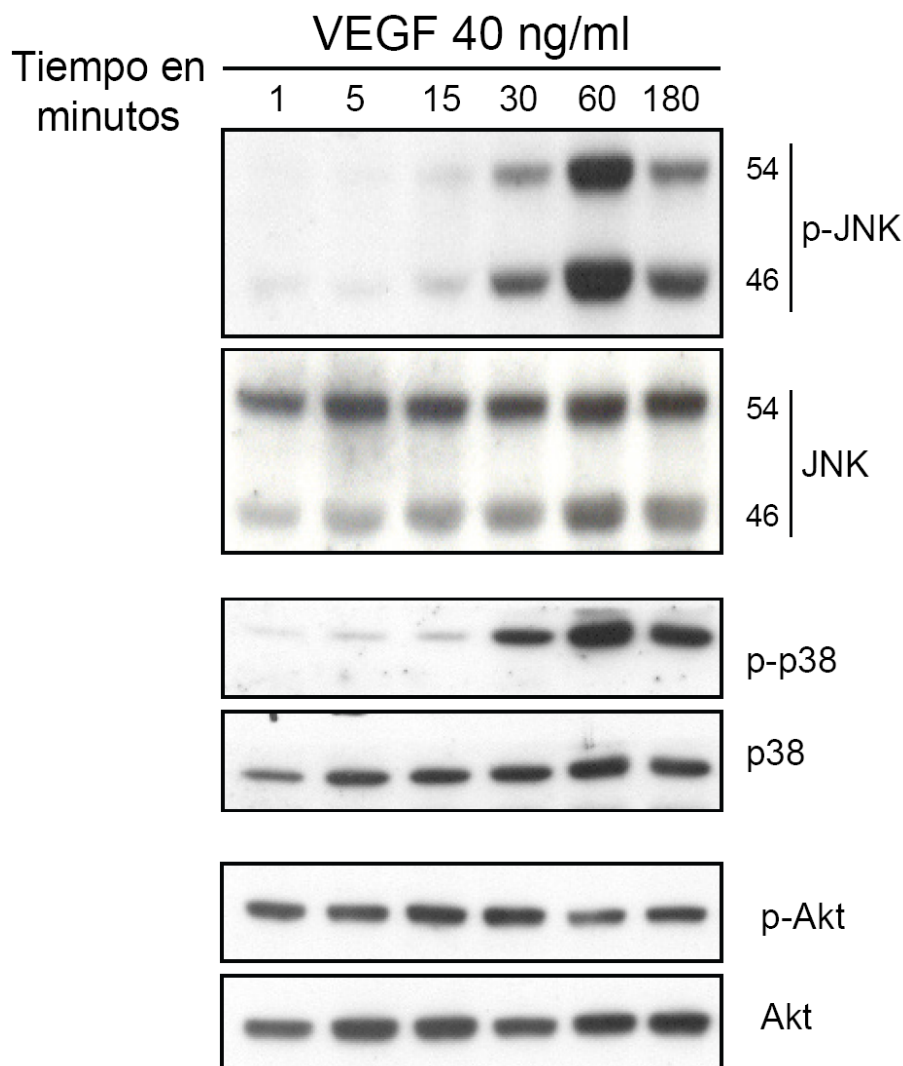


Figura 4.15: Western blot de p-JNK, p-p38 y p-Akt a partir de extractos totales de BAEC estimuladas con 40 ng/ml de VEGF durante los minutos indicados. En cada caso se comprobó la cantidad total, fosforilada y no fosforilada, de cada proteína para verificar la igualdad de carga de las muestras.

El VEGF no modifica la estabilidad de la proteína de HIF-1 α

Dado que la regulación clásica durante la hipoxia de HIF-1 α es a través de la inhibición de su degradación por el proteasoma y consecuente acumulación, nos preguntamos si el VEGF estaba actuando del mismo modo. En caso de no bloquear o disminuir la degradación por el proteasoma, la hipótesis siguiente sería la de suponer que existe un incremento en la cantidad de proteína de HIF-1 α sintetizada por la célula.

Para comprobar cual de ambas hipótesis es la correcta procedimos con un ensayo de inhibición de la síntesis de proteína mediante cicloheximida (10 μ g/ml) ¹⁹⁸. Las BAEC

4. Resultados

fueron estimuladas durante 6 horas con 40 ng/ml de VEGF o con 50 μ M de CoCl_2 y a continuación se añadió la cicloheximida durante los tiempos, indicados en la [Figura 4.16](#). La señal de HIF-1 α producida por el VEGF se comparó con aquella producida por el CoCl_2 , debida solo a la inhibición de la degradación, y encontramos que en el caso del VEGF la señal de HIF-1 α disminuye mucho más rápido que la del CoCl_2 ; en solo 15 minutos, la señal de HIF-1 α en el caso del VEGF se reduce más de la mitad, mientras que en el caso del CoCl_2 , dicha disminución no se alcanza ni tras 60 minutos de incubación con cicloheximida. De este modo, podemos concluir que el VEGF no ejerce efecto alguno sobre la degradación de HIF-1 α y que su capacidad de incrementar los niveles de HIF-1 α se debe a incrementos en la cantidad de proteína sintetizada por la célula. Quedaría averiguar si existe un incremento en la tasa de traducción de los ARNm de HIF-1 α , un incremento en la transcripción de dichos mensajeros o ambos procesos.

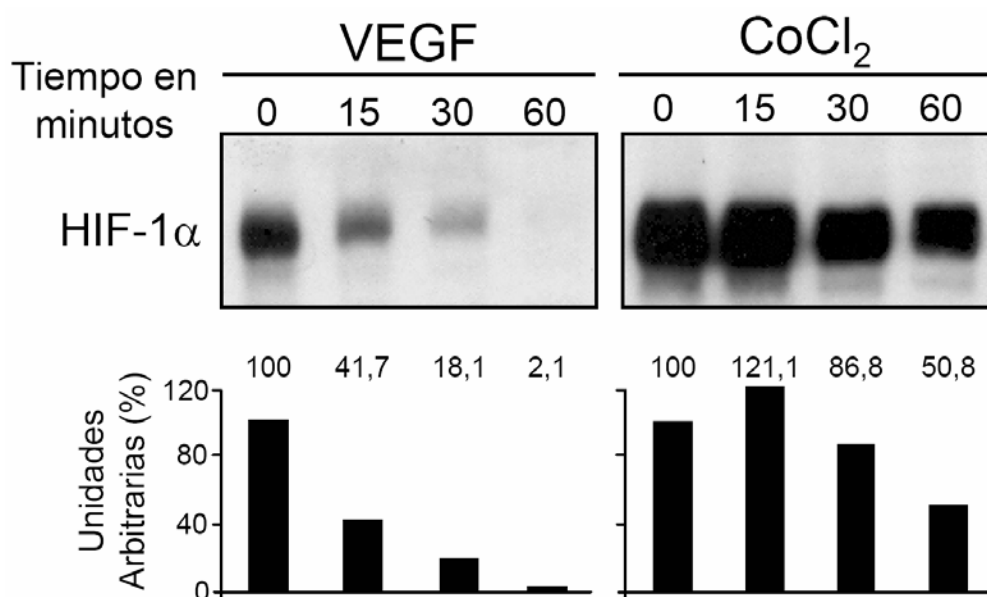


Figura 4.16: Western blot de HIF-1 α a partir de extractos nucleares de BAEC estimuladas con 40 ng/ml de VEGF (carril central) o 50 μ M de CoCl_2 . Tras 6 horas de estímulo se añadió al medio el inhibidor de la síntesis proteica cicloheximida (10 μ g/ml) y se incubó durante los minutos indicados. Las bandas de cada carril se densitometraron para comparar la velocidad de degradación de HIF-1 α según el estímulo.

Regulación del ARNm de HIF-1 α en células endoteliales

El VEGF y el O₂^{•-} incrementan los niveles del ARNm de HIF-1 α

El resultado obtenido en los ensayos de estabilidad con cicloheximida nos hizo preguntarnos si parte del incremento en los niveles de la proteína de HIF-1 α se deben a un aumento en la cantidad de ARNm del gen para esta subunidad de HIF-1. De ser así, la CE podría llegar a producir más proteína de la que la maquinaria de degradación pueda eliminar y explicaríamos en parte como se produce el acúmulo de HIF-1 α .

De este modo, diseñamos experimentos sobre BAEC confluentes consistentes en estimular durante distintos tiempos (6, 12 y 24 horas) con 40 ng/ml de VEGF, 2,5 mU/ml de XO ó 100 μ M de CoCl₂ y extrayendo el ARN total para llevar a cabo RT-PCR del ARNm para HIF-1 α . Si comparamos los resultados obtenidos (Figura 4.18), podemos ver como tanto el VEGF como el XO provocan incrementos significativos en los niveles del ARNm para HIF-1 α . Por su parte, el CoCl₂ no tiene efecto alguno sobre la expresión del mensajero.

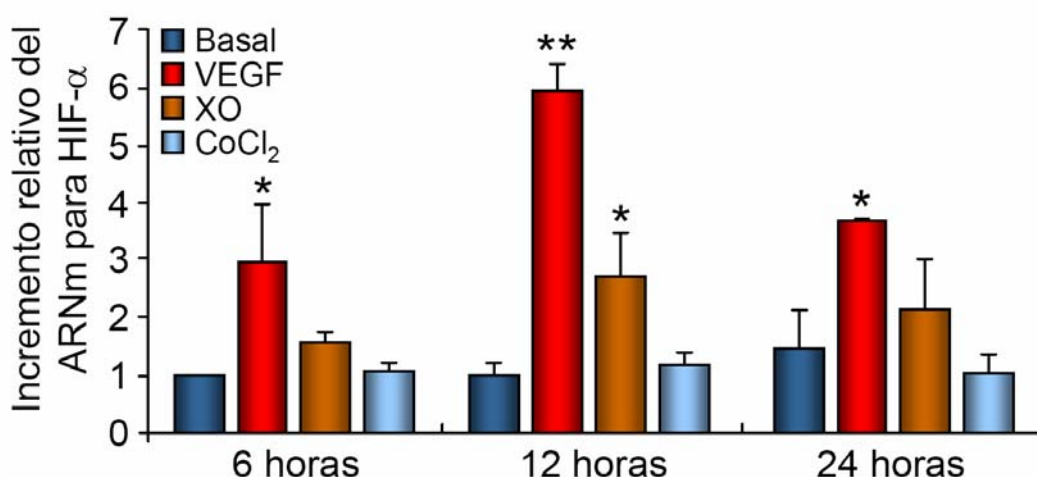


Figura 4.17: Medida mediante RT-PCR de la expresión del ARNm para HIF-1 α en BAEC tras 6, 12 y 24 horas de estímulo con 40 ng/ml de VEGF, 2,5 mU/ml de XO más 2 mM de HX ó 100 μ M de CoCl₂. Los valores están normalizados al basal de las 6 horas. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ con respecto al nivel basal de las 6 horas.

Seguidamente, conociendo la participación de la NADPH oxidasa y el O₂^{•-} en los incrementos de la proteína de HIF-1 α y dada la capacidad de la XO para incrementar los niveles de su ARNm, quisimos comprobar si a este nivel de regulación también intervienen ambos factores. De este modo, estimulamos BAEC confluentes con 40 ng/ml de VEGF ó 2,5 mU/ml de XO en ausencia o presencia de 1 mM de apocinina o 25 μ M de MnTMPyP durante 12 horas. Como puede verse en la Figura 4.18, el bloqueo de la NADPH oxidasa mediante el uso de apocinina o la eliminación de O₂^{•-} mediante el uso de MnTMPyP elimina gran parte del incremento producido por el VEGF o la XO.

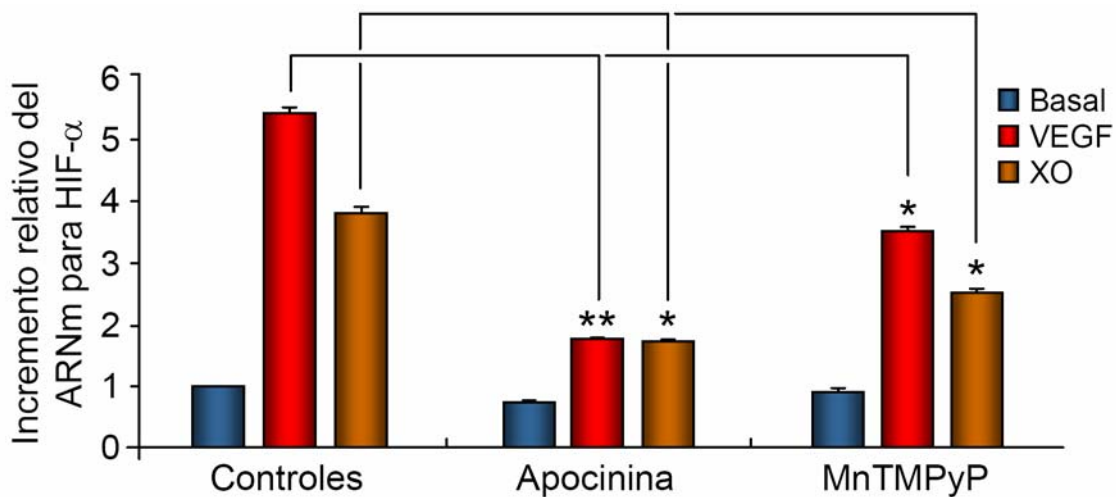


Figura 4.18: Medida mediante RT-PCR de la expresión del ARNm para HIF-1 α en BAEC tras 12 horas de estímulo con 40 ng/ml de VEGF ó 2,5 mU/ml de XO más 2 mM de HX y en presencia o no de apocinina (1 mM) o MnTMPyP (25 μ M). Los valores están normalizados al basal del grupo de controles. * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ con respecto al control correspondiente.

El VEGF aumenta sobre su propia expresión en células endoteliales

Dado que HIF-1 es el principal factor de transcripción para el gen de VEGF y puesto que hemos demostrado la capacidad del VEGF para incrementar los niveles de HIF-1 α , nos preguntamos si el VEGF añadido exógenamente podría inducir la expresión de su propio gen.

El VEGF incrementa la actividad transcripcional en su propio promotor

Usando un vector reportero comercial de luciferasa que contiene la secuencia promotora del gen para el VEGF podemos averiguar si el VEGF puede incrementar la actividad transcripcional en su propio promotor. De este modo, BAEC transfectadas con esta construcción o con su respectiva construcción control sin región promotora fueron estimuladas con 40 ng/ml de VEGF en presencia o no de 1 mM de apocinina ó 25 μ M de MnTMPyP durante 24 horas. En la [Figura 4.19](#) puede verse un claro incremento de la actividad transcripcional en presencia de VEGF y una significativa inhibición de la misma si añadimos apocinina o MnTMPyP. los resultados revelaron que el VEGF incrementa la actividad transcripcional de su propio gen y dicho proceso está mediado por $O_2^{\cdot -}$ y los complejos NADPH oxidasas.

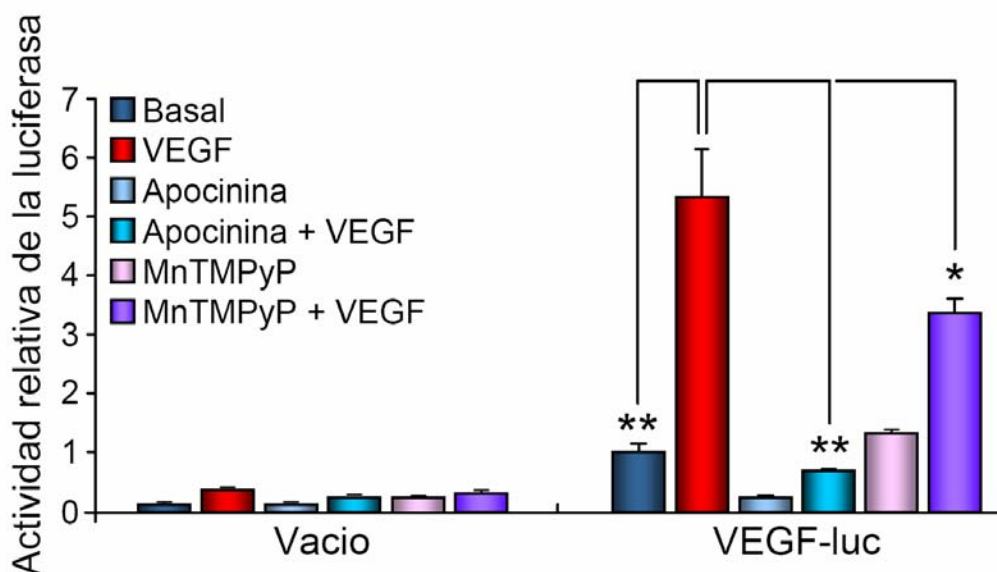


Figura 4.19: Medida de la actividad transcripcional del promotor del gen para VEGF mediante un vector reportero portador del gen para la luciferasa y cuya expresión depende de dicho promotor. Se realizó en BAEC estimuladas durante 24 horas con 40 ng/ml de VEGF y en presencia o no de apocinina (1 mM) ó MnTMPyP (25 μ M). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ con respecto al tratamiento con VEGF.

El VEGF y el $O_2^{\cdot -}$ incrementan los niveles del ARNm para VEGF

Conociendo la capacidad del VEGF para incrementar la actividad transcripcional de su propio gen y que el $O_2^{\cdot -}$ producido por la NADPH oxidasa está implicado en dicho proceso, nos preguntamos si el VEGF sería capaz de producir aumentos en los niveles de expresión del ARNm del propio VEGF. De este modo, diseñamos experimentos sobre BAEC confluentes consistentes en estimular durante distintos tiempos (6, 12 y 24 horas) con 40 ng/ml de VEGF ó 2,5 mU/ml de XO y extrayendo el ARN total para llevar a cabo RT-PCR del ARNm para VEGF. Si comparamos los resultados obtenidos (Figura 4.20), podemos ver como tanto el VEGF como el XO provocan incrementos significativos con un máximo de expresión a las 12 horas.

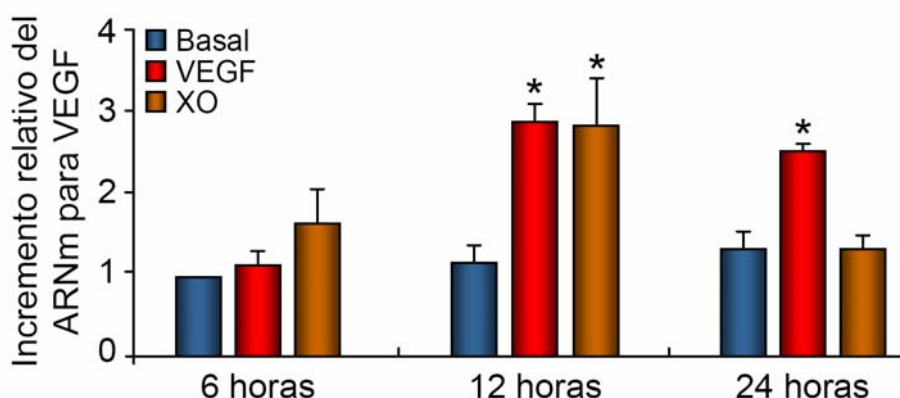


Figura 4.20: Medida mediante RT-PCR de la expresión del ARNm para VEGF en BAEC tras 6, 12 y 24 horas de estímulo con 40 ng/ml de VEGF ó 2,5 mU/ml de XO más 2 mM de HX. Los valores están normalizados al basal de las 6 horas. * $p < 0.05$ con respecto al nivel basal de las 6 horas.

Dada la capacidad de la XO para incrementar los niveles del ARNm de VEGF, al igual que con los experimentos para estudiar la expresión del ARNm de HIF-1 α , quisimos comprobar si a este nivel de regulación también intervienen la NADPH oxidasa y el O₂^{•-}. De este modo, estimulamos BAEC confluentes con 40 ng/ml de VEGF ó 2,5 mU/ml de XO en ausencia o presencia de 1 mM de apocinina o 25 μ M de MnTMPyP durante 12 horas. Como puede verse en la [Figura 4.21](#), el bloqueo de la NADPH oxidasa mediante el uso de apocinina o la eliminación de O₂^{•-} mediante el uso de MnTMPyP bloquea el efecto del VEGF o la XO.

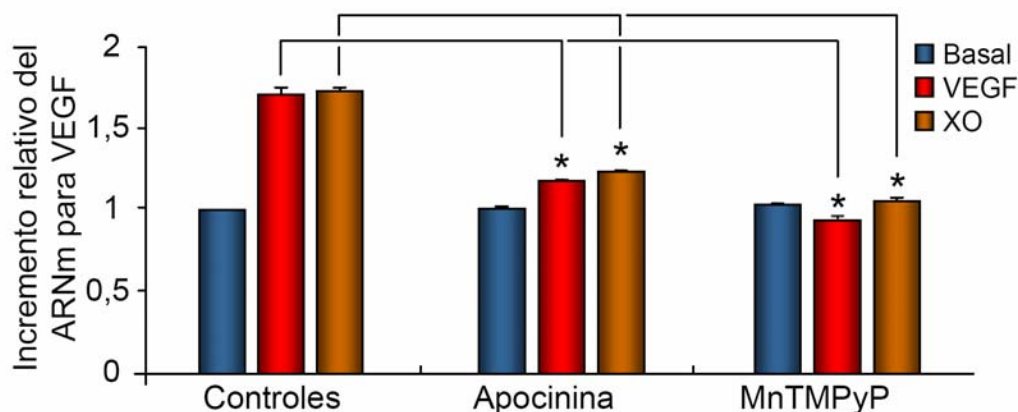


Figura 4.21: Medida mediante RT-PCR de la expresión del ARNm para VEGF en BAEC tras 12 horas de estímulo con 40 ng/ml de VEGF ó 2,5 mU/ml de XO más 2 mM de HX y en presencia o no de apocinina (1 mM) ó MnTMPyP (25 μ M). Los valores están normalizados al basal del grupo de controles. * $p < 0.05$ con respecto al control correspondiente.

El VEGF y el O₂^{•-} incrementan los niveles de la proteína de VEGF

De acuerdo con los resultados descritos en los dos apartados anteriores, nuestro siguiente y último objetivo fue determinar si, al igual que para el caso del ARNm, la expresión de la proteína de VEGF está incrementada en CE estimuladas con VEGF exógeno o con el O₂^{•-} producido por la NADPH oxidasa. De este modo, y mediante ensayos de inmunofluorescencia, estimulamos BAEC con 40 ng/ml de VEGF en ausencia o presencia de 1 mM de apocinina ó 25 μ M de MnTMPyP durante 24 horas. Como puede verse en la [Figura 4.22](#), existe un incremento de la señal cuando las CE son estimuladas con VEGF. Por su parte, el bloqueo mediante apocinina de la NADPH oxidasa o la eliminación de O₂^{•-} mediante el uso de MnTMPyP reduce significativamente dicho efecto. En resumen, el VEGF es capaz de autoinducirse en CE a través de la NADPH oxidasa y el O₂^{•-} producido por esta.

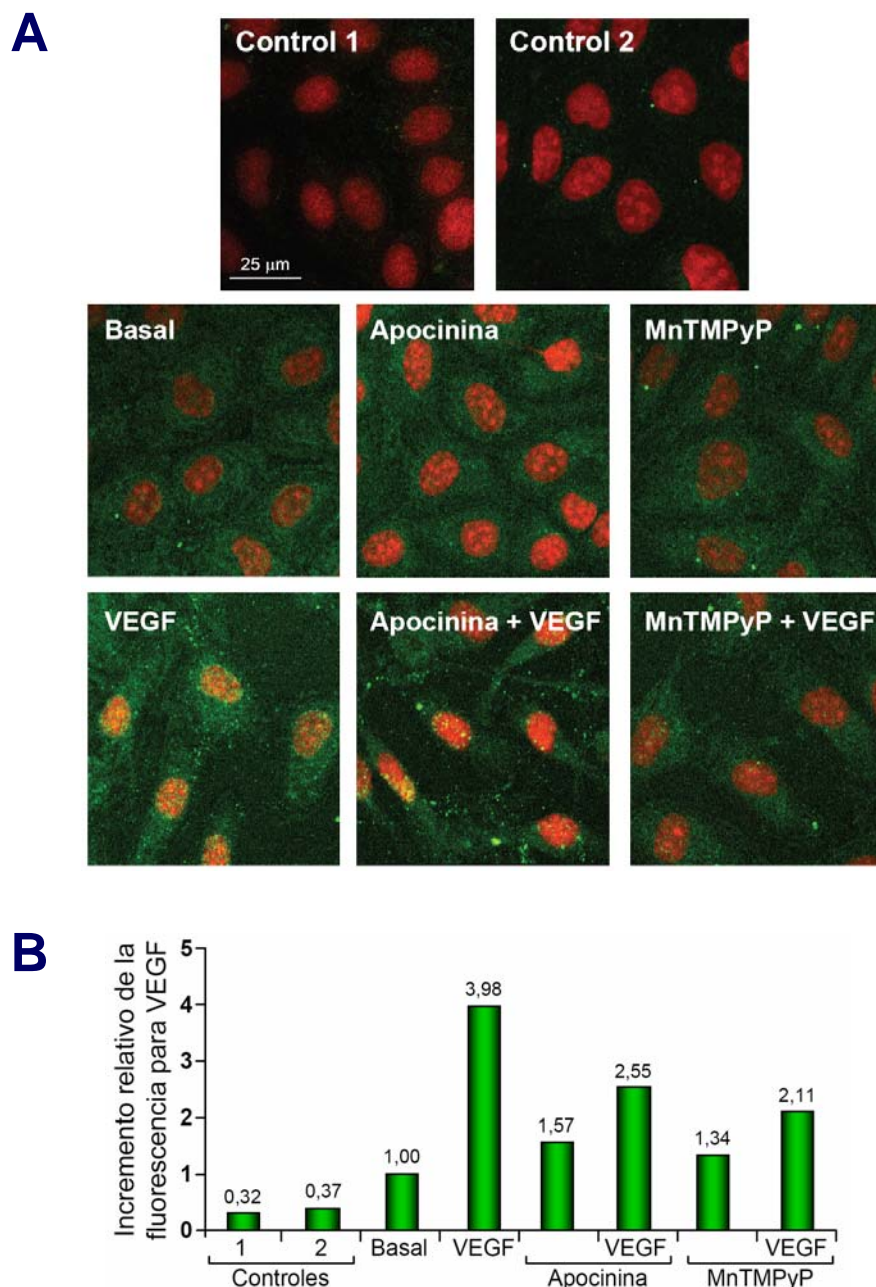


Figura 4.22: A: Inmunofluorescencia para VEGF. Microfotografías obtenidas por microscopia confocal de BAEC estimuladas durante 24 horas con vehículo (Basal) ó 40 ng/ml de VEGF y en presencia o no de 1 mM de apocinina ó 25 μ M de MnTMPyP. El **Control 1** de la inmunofluorescencia se realizó con un anticuerpo primario no específico y el **Control 2** sin anticuerpo primario. La señal en verde corresponde al marcaje de la proteína para VEGF. La señal en rojo corresponde a los núcleos de las células marcadas con ioduro de propidio. **B:** Representación del incremento relativo de la intensidad de fluorescencia para el marcaje de VEGF tras densitometrar las imágenes del apartado A y compararla con la señal del punto basal. Se asignó como valor “1” la señal de fluorescencia del basal.



5. Discusión

El VEGF y sus efectos sobre la CE han sido, son y seguirán siendo objetivo de estudio y discusión de ininidad de grupos de investigación de todo el mundo y de campos de la biología y medicina muy diversos. Nuestro grupo de investigación siempre ha estado interesado en el papel que el VEGF tiene en los procesos de protección endotelial frente a distintas situaciones de estrés celular como puede ser el efecto citotóxico de la ciclosporina A ¹⁹⁹⁻²⁰¹, el estrés oxidativo ^{154,202,203}, o la apoptosis desencadenada por la pérdida de uniones celulares o anoikis ²⁰⁴. En esta tesis presentamos un mecanismo celular de señalización del VEGF desconocido hasta la fecha y cuyo papel en la biología del endotelio puede ser considerado secundario pero que creemos es parte necesaria del todo que constituye la regulación de la función celular en las CE.

El VEGF incrementa los niveles nucleares de la proteína HIF-1 α de manera concentración y tiempo dependiente en las células endoteliales y en condiciones de normoxia

El principal resultado del presente estudio es la confirmación de una fuerte estimulación del VEGF sobre HIF-1 α , la subunidad reguladora del HIF-1, actualmente considerado como el principal regulador transcripcional del propio VEGF. Aunque existe evidencias anteriores sobre cómo otros factores de crecimiento activan HIF-1 ^{149,152,192,205,206}, la acción del VEGF sobre HIF-1 es la primera vez que se describe. Tanto en el caso del VEGF como en otros factores de crecimiento, la característica principal de la acción sobre HIF-1 es que esta se realiza en condiciones no hipóxicas, es decir, en condiciones en las cuales la ruta de degradación para HIF-1 α permanece aparentemente inalterada.

La elección de este factor de crecimiento, se debe a 3 motivos:

1. Las CE poseen receptores para el VEGF.
2. El VEGF es uno de los factores de crecimiento más importante para las CE.
3. Para el gen del VEGF, el principal regulador transcripcional es el propio HIF-1.

Por todo esto, el efecto sobre HIF-1 por parte de VEGF puede suponer un mecanismo de retroalimentación no descrito hasta la fecha para HIF-1.

Siguiendo la metodología de trabajos anteriores ^{149,150,192}, nuestros primeros resultados indican claramente la capacidad del VEGF para aumentar los niveles de la proteína para HIF-1 α de manera concentración (Figura 4.1) y tiempo (Figura 4.2) dependiente y en condiciones de normoxia. Además, este incremento lo hemos podido observar mediante técnicas de Western blot (Figuras 4.1 y 4.2). A este nivel, nuestros resultados son similares al de anteriores estudios con otros factores de crecimiento como el de Spinella *et al* ¹⁵⁰. En estos estudios, se intuye la existencia de un mecanismo alternativo al bloqueo de la degradación basándose en el tiempo que tarda el estímulo para incrementar los niveles de

HIF-1 α . Efectivamente, el estímulo clásico para HIF-1 es la disminución de la concentración de O₂. Por debajo de un umbral crítico ⁶⁸ produciéndose un incremento de la subunidad α de HIF-1 en cuestión de pocos minutos y no de horas como en el caso de la trombina, la interleuquina 1 β , el ligando del receptor HER2, la endotelina 1, o nuestro VEGF ^{149,150,161,192,193}. Por supuesto, esta hipótesis debe ser comprobada con estudios dirigidos específicamente a averiguar la estabilidad real de la proteína para HIF-1 α en nuestras condiciones experimentales, en normoxia, comparándola con aquella inducida por una situación hipóxica real o simulada (usando CoCl₂, por ejemplo). Estos estudios serán analizados más adelante.

Tras descubrir la capacidad del VEGF para incrementar los niveles de la proteína para HIF-1 α en CE de origen bovino (BAEC), quisimos saber si se repetía el fenómeno en CE de origen humano, concretamente CE provenientes de venas de cordones umbilicales humanos. Efectivamente, encontramos la misma respuesta dependiente de concentración que en las BAEC (Figura 4.3). Este resultado otorga mayor importancia al hipotético mecanismo que, de manera distinta a la vía clásica, provoca incrementos sobre HIF-1 α ; nos está indicando que dicho mecanismo podría estar presente en todas las CE independientemente del tejido en el que se encuentren.

También queremos comentar, que el no detectar la proteína de HIF-1 α en el citoplasma mediante técnicas de Western Blot (Figura 4.1 y 4.2) nos sirvió para confirmar la eficacia del método de extracción fraccional empleado ¹⁸⁷. Durante el proceso de extracción se obtiene primeramente la fracción citoplasmática, y si se hubiesen lisado los núcleos celulares antes de tiempo (por ejemplo por un exceso de incubación con el tampón de lisis citoplasmático) el contenido de estos se recogería junto con las proteínas citoplasmáticas y por tanto podría detectarse la proteína de HIF-1 α . Así mismo, dado que la proteína de HIF-1 α solo es detectada en el extracto nuclear, podemos afirmar que el VEGF es capaz también de inducir muy rápidamente su translocación al núcleo celular, lo que nos hace preguntarnos si se está produciendo la unión de HIF-1 α con la subunidad β y por tanto la activación del factor de transcripción. De confirmarse la funcionalidad transcripcional de HIF-1, estos datos implicarían la muy posible existencia de un proceso de retroalimentación positivo en ambientes con alta concentración de VEGF como es el caso de tumores malignos.

La EPO no tiene efecto sobre los niveles de HIF-1 α en las células endoteliales

La elección de la EPO se debe a los mismos motivos que en el caso del VEGF; 1) las CE poseen receptores para la EPO, 2) la EPO ejerce importantes efectos sobre la CE ²⁰⁷ y 3) su gen está regulado transcripcionalmente por el propio HIF-1 ^{71,72}, por lo que un posible efecto sobre HIF-1 por parte de la EPO también supondría un mecanismo de retroalimentación no descrito hasta la fecha para HIF-1. Sin embargo, en este caso no

encontramos efecto alguno por parte de la EPO sobre HIF-1 α (ver [Figura 4.4](#)), lo que viene a significar que no estamos ante un mecanismo generalizado de retroalimentación y que el efecto del VEGF sobre HIF-1 es un caso particular cuya trascendencia aun tiene que ser mejor estudiada.

Por otro lado, consideramos que la ausencia de efecto de la EPO sobre HIF-1 tiene una gran importancia médica, dado que existe un amplio uso terapéutico de distintas formas de EPO en la actualidad. Esto es particularmente interesante por el hecho de que las distintas formas de EPO de uso actual ejercen potentes efectos en procesos angiogénicos y citoprotectores ²⁰⁸, pero en nuestra opinión, al menos no existe una potenciación de los efectos de HIF-1. De todos modos, dada la importancia médica del uso de distintas formas de EPO, y aunque existe una gran diferencia en los mecanismos de señalización intracelular entre ambos factores de crecimiento ^{209,210}, las diferencias entre VEGF y EPO y su influencia sobre HIF-1 merecen ser mejor estudiadas.

La capacidad del VEGF para incrementar los niveles de HIF-1 α en células endoteliales se debe tanto al VEGFR1 como al VEGFR2

A continuación, quisimos analizar la importancia de los dos receptores para el VEGF presentes en las CE. Para ello, utilizamos el PIGF, un factor de crecimiento que sólo puede unirse al VEGFR1. Como mostramos en la [Figura 4.5](#), el PIGF es también capaz de provocar incrementos en los niveles nucleares de la proteína para HIF-1 α y por tanto, demostramos que la señalización a través del VEGFR1 es suficiente para dicho incremento. Recientemente se ha descrito un mecanismo muy similar pero en condiciones de hipoxia y en células tumorales humanas ²¹¹⁻²¹³, en estos trabajos existe una relación entre el VEGF, su receptor 1 y HIF-1, y se sugiere que el papel del VEGFR1 es mediar en un circuito de alimentación autocrina que favorecería la supervivencia de la célula tumoral en condiciones de hipoxia. Dada el menor número de funciones atribuidas a este receptor en comparación con el VEGFR2 ⁷, este resultado supone un novedoso papel para este receptor, y nuestros datos se suman a los de estos trabajos anteriores.

Sin embargo, en nuestros resultados, si comparamos la acción del PIGF y el VEGF, vemos que la señal de HIF-1 α necesita una mayor concentración de PIGF para que comience a ser detectable. Teniendo en cuenta que la constante de unión del PIGF al VEGFR1 es mayor que la del VEGF a cualquiera de sus receptores ⁴², todo parece indicar que el efecto del VEGF sobre los niveles de HIF-1 α ocurre a través de ambos receptores presentes en la CE, VEGFR1 y VEGFR2.

El $O_2^{\cdot-}$ producido por los complejos NADPH oxidadas es el mediador de la acción del VEGF sobre HIF-1 α en las células endoteliales

Hasta la fecha, existe una sorprendente gran cantidad y variedad de estímulos capaces de provocar incrementos en la actividad del complejo de la NADPH oxidasa y por tanto, de incrementar los niveles de ROS intracelulares de la CE. La angiotensina II, y el propio estrés de flujo son dos buenos ejemplos de esta variedad de estímulos ²¹⁴⁻²²⁰. El VEGF, también activa esta fuente de ROS intracelular ¹⁰⁹⁻¹¹³ considerada como la más importante en las CE ¹⁰⁹, por lo que quisimos comprobar que en nuestro modelo de estudio, cultivo primarios de BAEC en normoxia, el VEGF tenía este efecto. Efectivamente, mediante el uso de dihidrorodamina y dihidroetidina, sabemos que una concentración de 40 ng/ml de VEGF es suficiente para incrementar los niveles de ROS intracelulares tras solo 60 minutos de estímulo (Figura 4.6) y concretamente los niveles de $O_2^{\cdot-}$ (Figura 4.9 y 4.10).

Una vez comprobada la capacidad del VEGF para incrementar los niveles de ROS, y dado que existe una relación entre distintas ROS y HIF-1 en determinadas situaciones, como puede ser la hipoxia ²²¹⁻²²⁸, quisimos verificar si en nuestro modelo también podíamos observar incrementos en los niveles de HIF-1 α . Sorprendentemente, hemos encontrado que no existe efecto del H_2O_2 sobre HIF-1 α (Figura 4.7), cuando el número de trabajos que pueden consultarse en la literatura y que muestra lo contrario es bastante grande ^{221,222,229,230}. Ante este resultado, primeramente comprobamos si nuestra maniobra de estimulación de las CE con H_2O_2 exógeno era correcta, pero tras verificarlo con la activación de NF- κ B (Figura 4.8), un factor de transcripción muy sensible a las variaciones en la concentración de ROS ²³¹, consideramos que en las CE no existe relación directa entre H_2O_2 y HIF-1 α como si parece existir en otros tipos celulares.

En la mayoría de los trabajos que hemos estudiado, se analiza el efecto de las ROS más estables (como el H_2O_2) por una clara cuestión de facilidad experimental, pero en el caso de estimular un cultivo celular con H_2O_2 colocamos a las células en la anómala situación de encontrarse instantáneamente ante una molécula que debería provenir de la transformación previa de una ROS anterior. Por el contrario, el sistema HX/XO produce incrementos en $O_2^{\cdot-}$ y es la propia CE la que a través de sus sistemas antioxidantes va transformando el exceso de $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 y después en H_2O . Es decir, consideramos que el sistema generador de $O_2^{\cdot-}$ de la HX/XO es una aproximación más realista a “lo que la célula hace” cuando por efecto del estímulo exterior que sea, esta decide variar los niveles de sus ROS. En este caso, el sistema HX/XO así como el uso de un mimético de la SOD, el MnTMPyP, demuestra que es el $O_2^{\cdot-}$ el desencadenante de los incrementos en HIF-1 α . Por otro lado, los experimentos con L-NAME diseñados para analizar la posible formación de ONOO $^-$ a partir del $O_2^{\cdot-}$ y el NO que se produce simultáneamente por acción del VEGF sobre la CE ²³², no muestran que exista una conexión relevante entre ONOO $^-$ y HIF-1 α .

Esto deja en nuestra opinión al $O_2^{\cdot -}$ como único responsable de la mediación entre VEGF y HIF-1 en nuestro modelo.

Además, nuestros resultados muestran una posible relación entre los receptores para el VEGF y los complejos enzimáticos NADPH oxidasas. Esto es consecuente con el trabajo de varios grupos destacadas en este campo de investigación ^{119,155}. En resumen, hemos encontrado similitudes descritas para los aumentos observados por efecto de otros factores de crecimiento pero también importantes novedades como es el papel que juega el $O_2^{\cdot -}$ en la señalización del VEGF como segundo mensajero. Este hecho supone una nueva forma de interpretación de los procesos de señalización para el VEGF en la CE. Ciertamente, ya estaba descrita la capacidad del $O_2^{\cdot -}$ para estimular la producción de VEGF ^{111,119,233,234}, pero en nuestros resultados, al contrario que la literatura actual, comprobamos que existe una gran especificidad demostrada por el hecho de que el H_2O_2 no consigue provocar los aumentos descritos para HIF-1 α . Por otro lado, el uso del inhibidor específico de las NADPH oxidasas, la apocinina (Figura 4.11), así como el uso de CE transfectadas con el dominante negativo para Rac1 (Figura 4.12) o el oligonucleótido antisentido para p67^{phox} (Figura 4.13), siendo Rac1 y p67^{phox} piezas indispensables del complejo de las NADPH oxidasas ^{117,118,235}, demuestra que la fuente principal de $O_2^{\cdot -}$ proviene de estos complejos enzimáticos y que existe una activación de los mismos tras producirse la unión del VEGF a sus receptores específicos en la CE. Como muestra de la importancia práctica de estos resultados, hay que destacar el uso clínico experimental existente para la apocinina en modelos de retinopatía isquémica ²³⁶.

El estrés oxidativo, y en general el incremento de ROS, se ha relacionado con numerosas patologías, considerándolos, junto con otros factores, como responsables de muchas de las lesiones descritas para cada una de esas patologías ¹¹⁴. Sin embargo, como hemos visto, las variaciones en el estado redox también se encuentran relacionadas con procesos de señalización de factores de crecimiento. Se encuentran por tanto relacionadas con la membrana celular, donde se localizan los receptores para dichos factores y donde se produce la interacción de estos con las proteínas responsables de la activación o inhibición de importantes rutas de señalización. Esto es importante, conviene hacer hincapié, ya que puede implicar que las variaciones locales (en este caso regiones cercanas a la membrana celular) pueden ejercer sus efectos de modo controlado, o al menos con efectos reducidos en cuanto a su influencia sobre otras regiones celulares. No es correcto por tanto, hablar de la alteración del estado redox celular en general como algo negativo. Queda saber que mecanismos usa la CE para controlar el estado redox a nivel intracelular. El incremento de HIF-1 α por efecto de ROS no es algo nuevo dentro de una condición de hipoxia ^{221,222}, pero el papel del superóxido en la inducción de los niveles de HIF-1 α por parte del VEGF y en condiciones de normoxia, es un resultado completamente novedoso.

Las rutas de las JNK, p38 MAPK y PI3K son necesarias para que el VEGF actúe sobre HIF-1 α en células endoteliales

Hemos descubierto la implicación de ciertas vías de señalización intracelular en los incrementos observados en HIF-1 α por efecto del VEGF y el O₂^{•-}. Los experimentos que hemos realizado con inhibidores específicos ampliamente utilizados en esta clase de estudios preliminares, sugieren al menos la participación de las JNK, la MAPK p38 y la PI3K en dichos incrementos (Figura 4.14). Además, la activación de las JNK y la MAPK p38 por efecto del VEGF (Figura 4.15), que hemos podido comprobar en nuestro modelo a través de inmunoblot para las formas fosforiladas de estas proteínas, es coincidente con anteriores trabajos de diversos grupos ²⁰⁶. Por otro lado, aunque no hemos podido comprobar aun la capacidad del O₂^{•-} generado por el VEGF en nuestro modelo para fosforilar estas quinasas, si existe mucha literatura donde se describe esa capacidad del O₂^{•-} así como la de otras ROS ^{108,131-133,135,136}. Sin embargo, la vía de la PI3K-PKB/Akt supone una interesante excepción; el estudio con el inhibidor específico de su ruta, la wortmanina, muestra que es, al menos en parte, necesaria para que el VEGF pueda aumentar los niveles de HIF-1 α (Figura 4.14), pero cuando hemos buscado aumentos en la fosforilación de la quinasa Akt tras estimular las CE con VEGF no hayamos diferencias significativas. Este hecho resulta sorprendente porque está previamente descrito la capacidad del VEGF para fosforilar la quinasa PKB/Akt ²³⁷, y la mejor explicación que encontramos consiste en considerar que nuestras condiciones experimentales; el que no lleve nada de suero, el medio de cultivo usado para depletar o el tiempo de depleción con dicho medio, hacen que PKB/Akt se encuentre de inicio fosforilada en gran parte. Como puede verse en la Figura 4.15, si comparamos la señal de la forma total con la fosforilada, encontramos que en todo momento del experimento, la señal de la forma p-PKB/Akt es máxima y constante. Otra explicación alternativa consistiría en considerar la posibilidad de que la fosforilación de PKB/Akt ocurre antes del primer minuto de estimulación, pero cuando realizamos una comprobación puntual del estado de fosforilación de PKB/Akt en nuestro modelo y sin estímulo con VEGF, encontramos el mismo grado de fosforilación que los experimentos descritos anteriormente. Este resultado apoya por tanto nuestra primera interpretación.

El VEGF no modifica la estabilidad de la proteína para HIF-1 α , pero si incrementa la expresión de su ARNm en las CE a través del complejo de la NADPH oxidasa y el O₂^{•-}

Como ya comentábamos anteriormente, el estímulo clásico de HIF-1 consiste en la disminución drástica de la concentración del O₂ y en consecuencia en una inhibición de la tasa de degradación de HIF-1 α . Esta inhibición conlleva a que en pocos minutos sea posible detectar la proteína para HIF-1 α mediante técnicas de Western blot.

En nuestro modelo, el incremento observado por efecto del VEGF tarda en manifestarse más de dos horas (Figura 4.1), por lo que nos hace pensar en la posible existencia de un mecanismo distinto al de la inhibición de la degradación. Para poder comparar la estabilidad de HIF-1 α según el estímulo que usemos, añadimos cicloheximida tras el incubar con los estímulos. La cicloheximida es un inhibidor de la síntesis de proteína¹⁹⁸ que impediría la acumulación de HIF-1 α de nueva síntesis. De este modo, si la estabilidad de los HIF-1 α acumulados por efecto de los estímulos es distinta en función de la naturaleza de estos últimos, observaremos diferencias en la intensidad de la señal de la proteína para HIF-1 α a medida que transcurre el tiempo desde la inhibición de la síntesis proteica; es decir, encontraremos que la señal de la proteína para HIF-1 α disminuye más deprisa cuanto menos estabilidad tenga. Hay que recordar que en nuestro modelo no se modifica la concentración del O₂, que el estímulo del VEGF es procesado por la CE en condiciones de normoxia y que por tanto, a priori, la CE mantiene intacta la maquinaria de marcaje y degradación para HIF-1 α .

Efectivamente, y tal como se describe para otros factores de crecimiento, en nuestro caso el VEGF no favorece de forma significativa el aumento de la estabilidad de HIF-1 α (Figura 4.16 si se compara con la estabilidad que aporta el CoCl₂, un mimético químico de la hipoxia que bloquea la maquinaria de marcaje para la degradación de HIF-1 α . La consiguiente pregunta a hacerse es lógica; si el VEGF no disminuye la tasa de degradación de HIF-1 α , ¿cómo se produce entonces el incremento observado en nuestros Western blots e inmunofluorescencias?. La respuesta también es lógica; si en presencia de VEGF, HIF-1 α se degrada con la, aparentemente, misma velocidad, los incrementos de su proteína deben producirse por un aumento final en la síntesis de nuevas subunidades de HIF-1 α . Queda solamente comprobarlo experimentalmente.

Una forma rápida y sencilla de analizar si existe un incremento en la síntesis de HIF-1 α consiste en cuantificar mediante RT-PCR la cantidad de ARNm para HIF-1 α que está produciendo la CE tras ser estimulada con VEGF. De tal modo, podemos asumir que a mayor cantidad de mensajeros, mayor cantidad de proteína es sintetizada. Efectivamente, como puede verse en la Figura 4.17, en sólo 6 horas ya existe entre dos y tres veces mayor número de ARNm para HIF-1 α en el caso de las CE tratadas con VEGF que en las CE no tratadas o aquellas tratadas con CoCl₂. Es interesante destacar este último hecho del CoCl₂ ya que es coincidente con la literatura²³⁸; la hipoxia o el CoCl₂ o no modifican la expresión del ARNm para HIF-1 α o producen ligeros incrementos.

Por otro lado, quisimos averiguar si en los incrementos descritos para los ARNm de HIF-1 α participa el O₂^{•-} o los complejos enzimáticos de la NADPH oxidasa. Para ello, nuevamente cuantificamos los mensajeros mediante RT-PCR de CE tratadas con VEGF en presencia o no de la apocinina, el inhibidor de las NADPH oxidasas, y el MnTMPyP, el mimético de SOD (Figura 4.19). Ambos compuestos bloquearan en mayor o menor grado el efecto del VEGF, pero, interesantemente, también el efecto del O₂^{•-} producido por el sistema HX/XO. En el caso del MnTMPyP no es extraño este resultado, ya que actúa

eliminando los $O_2^{\cdot -}$ directa e independientemente de su fuente de origen, indicándonos que el $O_2^{\cdot -}$ es necesario por lo menos en parte para que el VEGF incremente el número de ARNm para HIF-1 α , pero en el caso de la apocinina no es así; la apocinina no tiene efecto inhibitorio sobre la XO. Justamente, si recordamos la [Figura 4.11](#), la apocinina no bloqueaba el efecto del sistema HX/XO sobre la proteína para HIF-1 α , sin embargo, ahora si parece poder bloquear, y de forma más eficaz que el MnTMPyP, el efecto sobre los mensajeros para HIF-1 α . Estos resultados pueden parecer contradictorios, pero tenemos que tener en cuenta que: 1) el sistema HX/XO, a pesar de los potentes incrementos que provoca en la proteína de HIF-1 α (véase las [Figuras 4.7 ó 4.11](#)), no produce el mismo efecto sobre los mensajeros ([Figura 4.17](#)), cuyos incrementos son siempre menores que los producidos por el VEGF y 2) el MnTMPyP, a pesar de evitar totalmente los incrementos en la proteína de HIF-1 α en presencia de VEGF o XO ([Figura 4.11](#)), ahora no es capaz de bloquear con la misma eficacia los aumentos observados en los ARNm ([Figura 4.18](#)). Estas dos resultados en particular nos están indicando que el $O_2^{\cdot -}$ podría no ser tan crucial para que se produzcan los aumentos observados en los ARNm para HIF-1 α , y en conjunto con el efecto de la apocinina, nos lleva a considerar la existencia de al menos otro mecanismo celular implicado en los incrementos de los ARNm para HIF-1 α y en el que el correcto funcionamiento de los complejos NADPH oxidasa, aunque sea a un nivel basal, juegue un papel fundamental. Es decir, que el $O_2^{\cdot -}$ es imprescindible para que el VEGF pueda incrementar los niveles de la proteína para HIF-1 α , pero no para los de su mensajero y que la NADPH oxidasa está relacionada con otros mecanismos de señalización de la CE además de producir $O_2^{\cdot -}$ intracelularmente.

Un posible mecanismo candidato para participar en los incrementos de la proteína de HIF-1 α podría ser el que, debido a las activaciones de las quinasas p38 y JNK ([Figura 4.15](#)), se esté produciendo un incremento en la capacidad de traducción de los ARNm de la CE. Estas dos quinasas en particular se ven activadas por incrementos de ROS ¹³⁴, están implicadas en procesos de señalización de importantes factores para el endotelio como la angiotensina II en el caso de p38 ²³⁹, o el factor de crecimiento fibroblástico básico en el de las JNK ²⁴⁰ y desde hace tiempo se sabe que están relacionadas con factores de transcripción como NF- κ B, CREB, ATF-2 ó c-Jun ²⁴¹⁻²⁴⁴ e incluso el propio HIF-1 ^{206,245}. Por otro lado, JNK y p38 se encuentran al principio de rutas de señalización que, entre otras funciones, participan en la regulación de la actividad de los ribosomas al favorecer la fosforilación del factor de elongación 4E (eIF4E) ^{243,246}. Todo esto nos hace suponer un hipotético aumento en la tasa de traducción del conjunto de ARNm que posee la CE, entre ellos el de HIF-1 α , como respuesta a la activación de estas quinasas por VEGF y en la que se intuye la participación de alguna ROS. Curiosamente, p38 se activa en situaciones de hipoxia, pero JNK no ²⁴⁷, es decir, el VEGF podría estar usando mecanismos comunes a los desencadenados por una situación hipóxica pero también otros adicionales.

El VEGF incrementa su propia expresión en las células endoteliales

Dada la capacidad del VEGF para incrementar los niveles de HIF-1 α en el núcleo de las CE, el siguiente paso a seguir fue averiguar si el propio factor de transcripción del que forma parte la subunidad α es funcional. Para ello, estudiamos la capacidad del VEGF exógeno y el O₂[•] para incrementar el número de ARNm para el VEGF endógeno, así como la actividad transcripcional medida a través de un promotor con regiones HRE asociado al gen de la luciferasa. De hecho, al igual que con los mensajeros para HIF-1 α , tanto el VEGF como el O₂[•] producido por el sistema de la HX/XO, provocaron incrementos en la expresión del gen para el VEGF en BAEC aunque menos pronunciados (Figura 4.20).

En el caso de los ensayos de actividad de la luciferasa, la secuencia promotora elegida fue la comprendida entre los pares de base -2274 al 379 con respecto al sitio de inicio de la transcripción del gen para el VEGF humano¹⁸⁶. En estos ensayos de actividad, el VEGF produjo un considerable aumento de la expresión del gen de la luciferasa y mediante el uso de la apocinina y el MnTMPyP averiguamos que los complejos NADPH oxidasa son completamente necesarios para la inducción de la expresión y que el propio O₂[•] participa en el dicha inducción (Figura 4.19). Además, del mismo modo que con la expresión de ARNm para HIF-1 α , nuevamente nos encontramos con que el MnTMPyP no consigue bloquear totalmente el efecto del VEGF sobre la expresión de la luciferasa. Sin embargo, en las cuantificaciones de la expresión del gen para VEGF mediante RT-PCR, si encontramos un bloqueo efectivo por parte de la apocinina y el MnTMPyP (Figura 4.21)

Finalmente, quisimos verificar si el VEGF exógeno y el O₂[•] generado mediante el sistema HX/XO eran capaces de incrementar la proteína para el propio VEGF. Mediante técnicas de inmunofluorescencia, pudimos comprobar que ciertamente se producen aumentos en la señal para el anticuerpo anti-VEGF y que dichos aumentos se ven reducidos por la acción de la apocinina o el MnTMPyP (Figura 4.22). Una posible objeción metodológica a la observación del VEGF endógeno mediante inmunofluorescencia sería el hecho de que parte del VEGF exógeno que añadimos al cultivo es asimilado por la CE mediante procesos de reciclaje de receptores de membrana por endocitosis, pero dado que en las incubaciones con la apocinina y el MnTMPyP estaba presente el VEGF exógeno y aun así se observa una efectiva disminución en la señal, consideramos que nuestros resultados son correctos y consecuentes con los incrementos en la cantidad de ARNm para VEGF anteriormente descritos.

Con todo, aunque hemos podido demostrar la acumulación de la proteína para HIF-1 α y su translocación al núcleo de las CE por efecto del VEGF o el O₂[•], aun no podemos afirmar concluyentemente que el factor de hipoxia es el responsable total o parcial de los incrementos en la producción del VEGF endógeno observados.

Consideraciones finales

Aunque esta tesis doctoral no ha buscado relacionar la nueva información descubierta con ninguna patología en particular, es fácil conectar los hechos fundamentales que demuestran nuestros resultados con aspectos muy importantes de la biología de tumores sólidos y otras patologías relacionadas con el VEGF y el endotelio como pueden ser aquellas relacionadas con la formación incorrecta de vasos sanguíneos.

Sobre el propósito biológico de esta nueva señalización del VEGF sobre HIF-1, primero hay que destacar que se produce una amplificación de los efectos del VEGF a través de HIF-1 ya que el repertorio de genes cuya expresión se ve potenciada por acción del HIF-1 es muy amplio^{71,72} pero normalmente estos genes solo se activaran en condiciones de hipoxia, el primer y mejor estímulo conocido por el cual toma su nombre este factor de transcripción. De este modo, la CE consigue una mayor capacidad de respuesta que cobra especial interés en el ambiente presente en las cercanías de tumores sólidos, tumores con una permanente activación de HIF-1, entre otros factores de transcripción, y que producen enormes cantidades de VEGF^{248,249}. Por otro lado, en el contexto patológico, la conexión VEGF-HIF-1-VEGF presente en CE puede tener también su función en otras condiciones ambientales, como puede ser el propio ambiente hipóxico del interior (no las cercanías) de esta clase de tumores o bien en otras situaciones patológicas como puede ser la enfermedad cardíaca, la anemia o la preeclampsia.

El presente trabajo aporta información desconocida hasta la fecha sobre la biología de la CE. Entre los nuevos descubrimientos destaca primeramente el hecho de que el ARNm para VEGF y el VEGF autólogo se incrementan tras la exposición de las CE a VEGF exógeno. Aunque existe la posibilidad de efectos independiente a HIF-1, este hecho, así como el estudio de la actividad transcripcional del promotor del gen para VEGF, apoya la idea de que el HIF-1 incrementado es funcionalmente activo en términos de transactivación del gen para VEGF. Sería muy interesante por lo tanto el analizar la expresión de otros genes regulados por HIF-1, estudios que en esta tesis no se han realizado. Como segundo descubrimiento relevante hemos encontrado un papel protagonista en el $O_2^{\cdot-}$ mediador entre el VEGF y HIF-1, su principal activador transcripcional.

Con todo, el orden de señalización desde que el VEGF se une a sus receptores y se produce un incremento en el número de mensajeros y proteína para HIF-1 α y el propio VEGF, no queda establecido en este trabajo con suficiente claridad. Se hace necesario pues, futuros estudios que esclarezcan en la secuencia de acontecimientos celulares; ¿cómo interacciona los VEGFRs con las NADPH oxidasa?, ¿qué papel juega el $O_2^{\cdot-}$ producido por el VEGF en las fosforilaciones de p38 y JNK?, ¿cuál es la secuencia de activación de cada una de las quinasas?, así como el grado de importancia de cada vía involucrada. Otra cuestión sin resolver sería la señal que cierra el circuito VEGF-HIF-1. Una posible explicación es que sea necesaria una cierta cantidad de VEGF para provocar el suficiente incremento de HIF-1 α ; en nuestro modelo, añadimos el VEGF de manera

exógena en una gran concentración, mientras que en los sistemas biológicos, tal cantidad de VEGF solo es alcanzado en situaciones extraordinarias. Nuevamente nos acordamos de la vascularización de tumores sólidos y su gran producción de VEGF y consideramos que quizás estemos ante un mecanismo particular de este tipo de situaciones. Sin duda, estudios de la vascularización de tumores en animales tratados con apocinina, inhibidores de las rutas estudiadas o el propio MnTMPyP podrían revelarnos nuevos datos.

En resumen, los experimentos recogidos en esta tesis doctoral revelan una, hasta ahora desconocida, relación positiva en las CE entre el principal factor de crecimiento de estas, el VEGF, y su principal regulador transcripcional, el HIF-1, y en el que el $O_2^{\cdot-}$ resulta totalmente necesario. Es decir, el $O_2^{\cdot-}$ funciona en nuestro modelo como un segundo mensajero que media entre VEGF y HIF-1 en CE en condiciones de normoxia.



6. Conclusiones

1. El VEGF incrementa la síntesis de HIF-1 α de modo concentración y tiempo dependientes en cultivos primarios de células endoteliales en confluencia y en condiciones no hipóxicas, provocando además su translocación al núcleo. Por el contrario, la eritropoyetina no es capaz de producir estos efectos. El efecto del VEGF sobre HIF-1 α está mediado por el VEGFR1 y 2.
2. El mecanismo por el cual el VEGF regula los niveles de HIF-1 α en las células endoteliales requiere un incremento en los niveles de ROS. Concretamente, el aumento de O₂^{•-} es señal suficiente para el incremento descrito de HIF-1 α . El efecto del VEGF y el O₂^{•-} es totalmente suprimido por la molécula MnTMPyP, un mimético de la superóxido dismutasa permeable a través de la membrana celular.
3. Mediante el uso de un inhibidor específico de los complejos enzimáticos NADPH oxidasas, la apocinina, un dominante negativo de Rac1 y un antisentido para p67^{phox}, hemos descubierto que el efecto del VEGF sobre los niveles de HIF-1 α está mediado por el O₂^{•-} producido por estos complejos enzimáticos.
4. De modo paralelo, o bien a consecuencia del incremento en los niveles de O₂^{•-} provocado por el VEGF, se produce la activación de proteínas necesarias para el incremento de los niveles de HIF-1 α . Entre las proteínas estudiadas, hemos encontrado implicadas a las JNK, la MAPK p38 y la PKB/Akt.
5. Los estudios de cicloheximida indican que el VEGF incrementa los niveles de HIF-1 α sin disminuir apreciablemente su tasa de degradación. Debe existir por tanto un aumento en su producción. Concretamente, el VEGF a través del O₂^{•-} aumenta la síntesis del ARNm para HIF-1 α .
6. El VEGF, a través del O₂^{•-}, aumenta la síntesis del ARNm de su propio gen así como los niveles de proteína para VEGF. Estos resultados suponen una prueba sólida de la existencia de un circuito de retroalimentación del VEGF sobre si mismo en condiciones no hipóxicas.

En resumen, en esta tesis doctoral se describe un novedosa conexión de las CE entre el principal factor de crecimiento de estas, el VEGF, y su principal regulador transcripcional, el HIF-1, y en el que O₂^{•-} producido por la NADPH oxidasa resulta totalmente necesario.



7. Bibliografía

1. Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. **Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.** *Science* 1983. 219(4587):983-985.
2. Senger DR, Connolly DT, Van de WL, Feder J, Dvorak HF. **Purification and NH₂-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor.** *Cancer Res* 1990. 50(6):1774-1778.
3. Connolly DT, Olander JV, Heuvelman D, Nelson R, Monsell R, Siegel N, Haymore BL, Leimgruber R, Feder J. **Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells.** *J Biol Chem* 1989. 264(33):20017-20024.
4. Ferrara N, Henzel WJ. **Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1989. 161(2):851-858.
5. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT. **Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF.** *Science* 1989. 246(4935):1309-1312.
6. Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. **Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen.** *Science* 1989. 246(4935):1306-1309.
7. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. **VEGF receptor signalling - in control of vascular function.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006. 7(5):359-371.
8. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von EG, Joukov V, Saksela O, Orpana A, Pettersson RF, Alitalo K, Eriksson U. **Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. 93(6):2576-2581.
9. Joukov V, Pajusola K, Kaipainen A, Chilov D, Lahtinen I, Kukk E, Saksela O, Kalkkinen N, Alitalo K. **A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases.** *EMBO J* 1996. 15(2):290-298.
10. Lee J, Gray A, Yuan J, Luoh SM, Avraham H, Wood WI. **Vascular endothelial growth factor-related protein: a ligand and specific activator of the tyrosine kinase receptor Flt4.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. 93(5):1988-1992.
11. Orlandini M, Marconcini L, Ferruzzi R, Oliviero S. **Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. 93(21):11675-11680.
12. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA. **Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4).** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. 95(2):548-553.
13. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ii-Bovi P, Persico MG. **Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991. 88(20):9267-9271.
14. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Ferraro MG, Aprelikova O, Alitalo K, Del VS, Lei KJ, Chou JY, Persico MG. **Two alternative mRNAs coding for the angiogenic**

- factor, placenta growth factor (PIGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 1993. 8(4):925-931.
15. Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ. **Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus.** *J Virol* 1994. 68(1):84-92.
 16. Ogawa S, Oku A, Sawano A, Yamaguchi S, Yazaki Y, Shibuya M. **A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain.** *J Biol Chem* 1998. 273(47):31273-31282.
 17. Wise LM, Veikkola T, Mercer AA, Savory LJ, Fleming SB, Caesar C, Vitali A, Makinen T, Alitalo K, Stacker SA. **Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. 96(6):3071-3076.
 18. Suto K, Yamazaki Y, Morita T, Mizuno H. **Crystal structures of novel vascular endothelial growth factors (VEGF) from snake venoms: insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1.** *J Biol Chem* 2005. 280(3):2126-2131.
 19. Karkkainen MJ, Makinen T, Alitalo K. **Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research.** *Nat Cell Biol* 2002. 4(1):E2-E5.
 20. Stacker SA, Achen MG, Jussila L, Baldwin ME, Alitalo K. **Lymphangiogenesis and cancer metastasis.** *Nat Rev Cancer* 2002. 2(8):573-583.
 21. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. **Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3.** *Circulation* 1996. 93(8):1493-1495.
 22. Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW. **The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA.** *Mol Endocrinol* 1991. 5(12):1806-1814.
 23. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. **The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing.** *J Biol Chem* 1991. 266(18):11947-11954.
 24. Plouet J, Moukadi H. **Characterization of the receptor to vasculotropin on bovine adrenal cortex-derived capillary endothelial cells.** *J Biol Chem* 1990. 265(36):22071-22074.
 25. Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA, Ferrara N. **Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues.** *J Clin Invest* 1992. 89(1):244-253.
 26. Shen H, Clauss M, Ryan J, Schmidt AM, Tijburg P, Borden L, Connolly D, Stern D, Kao J. **Characterization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor receptors on mononuclear phagocytes.** *Blood* 1993. 81(10):2767-2773.

27. Pajusola K, Aprelikova O, Korhonen J, Kaipainen A, Pertovaara L, Alitalo R, Alitalo K. **FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines.** *Cancer Res* 1992. 52(20):5738-5743.
28. de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT. **The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor.** *Science* 1992. 255(5047):989-991.
29. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, Gunji Y, Jeltsch MM, Shibuya M, Alitalo K, Eriksson U. **Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. 95(20):11709-11714.
30. Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N. **Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR.** *J Biol Chem* 1994. 269(41):25646-25654.
31. Guo D, Jia Q, Song HY, Warren RS, Donner DB. **Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains. Association with endothelial cell proliferation.** *J Biol Chem* 1995. 270(12):6729-6733.
32. Waltenberger J, Claesson-Welsh L, Siegbahn A, Shibuya M, Heldin CH. **Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor.** *J Biol Chem* 1994. 269(43):26988-26995.
33. Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. **Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium.** *Nature* 1995. 376(6535):66-70.
34. Fong GH, Zhang L, Bryce DM, Peng J. **Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in flt-1 knock-out mice.** *Development* 1999. 126(13):3015-3025.
35. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, Pan YC, Olander JV, Connolly DT, Stern D. **Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration.** *J Exp Med* 1990. 172(6):1535-1545.
36. Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. **Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells.** *Nat Med* 1996. 2(10):1096-1103.
37. Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. **Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia.** *J Biol Chem* 1997. 272(38):23659-23667.
38. Kendall RL, Thomas KA. **Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. 90(22):10705-10709.

39. Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P. **Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor.** *Biochem Biophys Res Commun* 1992. 187(3):1579-1586.
40. Yamazaki Y, Takani K, Atoda H, Morita T. **Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2).** *J Biol Chem* 2003. 278(52):51985-51988.
41. Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC. **Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice.** *Nature* 1995. 376(6535):62-66.
42. Millauer B, Wizigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A. **High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis.** *Cell* 1993. 72(6):835-846.
43. Tuder RM, Flook BE, Voelkel NF. **Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide.** *J Clin Invest* 1995. 95(4):1798-1807.
44. Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. **VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis.** *Am J Physiol* 1996. 270(5 Pt 2):H1803-H1811.
45. Takagi H, King GL, Ferrara N, Aiello LP. **Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk gene expression through adenosine A2 receptors in retinal capillary endothelial cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996. 37(7):1311-1321.
46. Ferrara N, vis-Smyth T. **The biology of vascular endothelial growth factor.** *Endocr Rev* 1997. 18(1):4-25.
47. Carmeliet P. **Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis.** *Nat Med* 2000. 6(4):389-395.
48. Ferrara N. **Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis.** *Kidney Int* 1999. 56(3):794-814.
49. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. **Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro.** *Biochem Biophys Res Commun* 1992. 189(2):824-831.
50. Pepper MS, Wasi S, Ferrara N, Orci L, Montesano R. **In vitro angiogenic and proteolytic properties of bovine lymphatic endothelial cells.** *Exp Cell Res* 1994. 210(2):298-305.
51. Nicosia RF, Nicosia SV, Smith M. **Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis in vitro.** *Am J Pathol* 1994. 145(5):1023-1029.
52. Phillips GD, Stone AM, Jones BD, Schultz JC, Whitehead RA, Knighton DR. **Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea.** *In Vivo* 1994. 8(6):961-965.

53. Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, Lawitts JA, Benjamin L, Tan X, Manseau EJ, Dvorak AM, Dvorak HF. **Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis.** *J Exp Med* 2002. 196(11):1497-1506.
54. Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. **Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation.** *J Biol Chem* 1998. 273(46):30336-30343.
55. Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. **Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells.** *J Biol Chem* 1998. 273(21):13313-13316.
56. Tran J, Master Z, Yu JL, Rak J, Dumont DJ, Kerbel RS. **A role for survivin in chemoresistance of endothelial cells mediated by VEGF.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002. 99(7):4349-4354.
57. Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. **VEGF is required for growth and survival in neonatal mice.** *Development* 1999. 126(6):1149-1159.
58. Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van M, I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van BC, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P. **VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death.** *Nat Genet* 2003. 34(4):383-394.
59. Kilic U, Kilic E, Jarve A, Guo Z, Spudich A, Bieber K, Barzena U, Bassetti CL, Marti HH, Hermann DM. **Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells in vivo by activating ERK-1/2 and Akt pathways.** *J Neurosci* 2006. 26(48):12439-12446.
60. Wang Y, Mao XO, Xie L, Banwait S, Marti HH, Greenberg DA, Jin K. **Vascular endothelial growth factor overexpression delays neurodegeneration and prolongs survival in amyotrophic lateral sclerosis mice.** *J Neurosci* 2007. 27(2):304-307.
61. Bates DO, Curry FE. **Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca(2+)-dependent pathway.** *Am J Physiol* 1997. 273(2 Pt 2):H687-H694.
62. Kroll J, Waltenberger J. **VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR).** *Biochem Biophys Res Commun* 1998. 252(3):743-746.
63. Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, Izumi Y, Ang J, Yun CO, Buerk DG, Huang PL, Jain RK. **Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. 98(5):2604-2609.

64. Ku DD, Zaleski JK, Liu S, Brock TA. **Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries.** *Am J Physiol* 1993. 265(2 Pt 2):H586-H592.
65. Yang R, Thomas GR, Bunting S, Ko A, Ferrara N, Keyt B, Ross J, Jin H. **Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance.** *J Cardiovasc Pharmacol* 1996. 27(6):838-844.
66. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tatenos M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S. **Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells.** *J Exp Med* 2001. 193(9):1005-1014.
67. Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC, Ferrara N. **VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism.** *Nature* 2002. 417(6892):954-958.
68. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. **Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995. 92(12):5510-5514.
69. Crews ST, Fan CM. **Remembrance of things PAS: regulation of development by bHLH-PAS proteins.** *Curr Opin Genet Dev* 1999. 9(5):580-587.
70. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, Giallongo A. **Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1.** *J Biol Chem* 1996. 271(51):32529-32537.
71. Semenza GL, Neefelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. **Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991. 88(13):5680-5684.
72. Semenza GL, Wang GL. **A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation.** *Mol Cell Biol* 1992. 12(12):5447-5454.
73. Liu L, Simon MC. **Regulation of transcription and translation by hypoxia.** *Cancer Biol Ther* 2004. 3(6):492-497.
74. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. **A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997. 94(9):4273-4278.
75. Tian H, McKnight SL, Russell DW. **Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells.** *Genes Dev* 1997. 11(1):72-82.
76. Semenza GL. **HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia.** *J Appl Physiol* 2000. 88(4):1474-1480.
77. Jiang BH, Semenza GL, Bauer C, Marti HH. **Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension.** *Am J Physiol* 1996. 271(4 Pt 1):C1172-C1180.

78. Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C, Bradfield CA. **Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse.** *Mech Dev* 1998. 73(1):117-123.
79. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, Gassmann M, Gearhart JD, Lawler AM, Yu AY, Semenza GL. **Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha.** *Genes Dev* 1998. 12(2):149-162.
80. Pugh CW, Tan CC, Jones RW, Ratcliffe PJ. **Functional analysis of an oxygen-regulated transcriptional enhancer lying 3' to the mouse erythropoietin gene.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991. 88(23):10553-10557.
81. Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. **Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation.** *EMBO J* 2001. 20(18):5197-5206.
82. Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. **Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein.** *J Biol Chem* 2000. 275(33):25733-25741.
83. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. **Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein.** *EMBO J* 2000. 19(16):4298-4309.
84. Iyer NG, Ozdag H, Caldas C. **p300/CBP and cancer.** *Oncogene* 2004. 23(24):4225-4231.
85. Tian H, Hammer RE, Matsumoto AM, Russell DW, McKnight SL. **The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development.** *Genes Dev* 1998. 12(21):3320-3324.
86. Lando D, Pongratz I, Poellinger L, Whitelaw ML. **A redox mechanism controls differential DNA binding activities of hypoxia-inducible factor (HIF) 1alpha and the HIF-like factor.** *J Biol Chem* 2000. 275(7):4618-4627.
87. Maynard MA, Qi H, Chung J, Lee EH, Kondo Y, Hara S, Conaway RC, Conaway JW, Ohh M. **Multiple splice variants of the human HIF-3 alpha locus are targets of the von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase complex.** *J Biol Chem* 2003. 278(13):11032-11040.
88. Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T, Hara S, Jewett MA, Ohh M. **Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma.** *FASEB J* 2005. 19(11):1396-1406.
89. Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L. **Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression.** *Nature* 2001. 414(6863):550-554.
90. Drutel G, Kathmann M, Heron A, Schwartz JC, Arrang JM. **Cloning and selective expression in brain and kidney of ARNT2 homologous to the Ah receptor nuclear translocator (ARNT).** *Biochem Biophys Res Commun* 1996. 225(2):333-339.

91. Hirose K, Morita M, Ema M, Mimura J, Hamada H, Fujii H, Saijo Y, Gotoh O, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. **cDNA cloning and tissue-specific expression of a novel basic helix-loop-helix/PAS factor (Arnt2) with close sequence similarity to the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt).** *Mol Cell Biol* 1996. 16(4):1706-1713.
92. Bruick RK, McKnight SL. **A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF.** *Science* 2001. 294(5545):1337-1340.
93. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. **C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation.** *Cell* 2001. 107(1):43-54.
94. Huang LE, Pete EA, Schau M, Milligan J, Gu J. **Leu-574 of HIF-1alpha is essential for the von Hippel-Lindau (VHL)-mediated degradation pathway.** *J Biol Chem* 2002. 277(44):41750-41755.
95. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. **FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity.** *Genes Dev* 2001. 15(20):2675-2686.
96. Schofield CJ, Zhang Z. **Structural and mechanistic studies on 2-oxoglutarate-dependent oxygenases and related enzymes.** *Curr Opin Struct Biol* 1999. 9(6):722-731.
97. Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D, Pouyssegur J. **HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia.** *EMBO J* 2003. 22(16):4082-4090.
98. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. **Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions.** *Exp Mol Med* 2004. 36(1):1-12.
99. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG, Jr. **HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing.** *Science* 2001. 292(5516):464-468.
100. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. **The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.** *Nature* 1999. 399(6733):271-275.
101. Yu F, White SB, Zhao Q, Lee FS. **HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. 98(17):9630-9635.
102. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG. **Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein.** *Nat Cell Biol* 2000. 2(7):423-427.
103. Hershko A, Ciechanover A. **The ubiquitin system.** *Annu Rev Biochem* 1998. 67:425-479.

104. Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, Millhorn DE. **Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha.** *J Biol Chem* 2003. 278(18):15911-15916.
105. Arrigo AP, Tanaka K, Goldberg AL, Welch WJ. **Identity of the 19S 'prosome' particle with the large multifunctional protease complex of mammalian cells (the proteasome).** *Nature* 1988. 331(6152):192-194.
106. Nandi D, Tahiliani P, Kumar A, Chandu D. **The ubiquitin-proteasome system.** *J Biosci* 2006. 31(1):137-155.
107. Powell HW. **Revised nomenclature for radicals, ions, radical ions and related species.** *Pure Appl Chem* 1993. 65:1357-1499.
108. Bauer V, Bauer F. **Reactive oxygen species as mediators of tissue protection and injury.** *Gen Physiol Biophys* 1999. 18 Spec No:7-14.
109. Gorlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R. **A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall.** *Circ Res* 2000. 87(1):26-32.
110. Abid MR, Kachra Z, Spokes KC, Aird WC. **NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration.** *FEBS Lett* 2000. 486(3):252-256.
111. Abid MR, Tsai JC, Spokes KC, Deshpande SS, Irani K, Aird WC. **Vascular endothelial growth factor induces manganese-superoxide dismutase expression in endothelial cells by a Rac1-regulated NADPH oxidase-dependent mechanism.** *FASEB J* 2001. 15(13):2548-2550.
112. Colavitti R, Pani G, Bedogni B, Anzevino R, Borrello S, Waltenberger J, Galeotti T. **Reactive oxygen species as downstream mediators of angiogenic signaling by vascular endothelial growth factor receptor-2/KDR.** *J Biol Chem* 2002. 277(5):3101-3108.
113. Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, Alexander RW. **Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis.** *Circ Res* 2002. 91(12):1160-1167.
114. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. **Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease.** *Physiol Rev* 2007. 87(1):315-424.
115. Kamata H, Hirata H. **Redox regulation of cellular signalling.** *Cell Signal* 1999. 11(1):1-14.
116. Hordijk PL. **Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins.** *Circ Res* 2006. 98(4):453-462.
117. Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OT. **Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells.** *Am J Physiol* 1996. 271(4 Pt 2):H1626-H1634.

118. Bayraktutan U, Draper N, Lang D, Shah AM. **Expression of functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells.** *Cardiovasc Res* 1998. 38(1):256-262.
119. Ushio-Fukai M. **VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS.** *Antioxid Redox Signal* 2007. 9(6):731-739.
120. Li JM, Shah AM. **Intracellular localization and preassembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells.** *J Biol Chem* 2002. 277(22):19952-19960.
121. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. **NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease.** *Circ Res* 2000. 86(5):494-501.
122. Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B. **A model for p53-induced apoptosis.** *Nature* 1997. 389(6648):300-305.
123. Quillet-Mary A, Jaffrezou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J, Laurent G. **Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis.** *J Biol Chem* 1997. 272(34):21388-21395.
124. Beckman KB, Ames BN. **Oxidative decay of DNA.** *J Biol Chem* 1997. 272(32):19633-19636.
125. Henle ES, Linn S. **Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide.** *J Biol Chem* 1997. 272(31):19095-19098.
126. Finkel T. **Oxygen radicals and signaling.** *Curr Opin Cell Biol* 1998. 10(2):248-253.
127. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. **Oxidants as stimulators of signal transduction.** *Free Radic Biol Med* 1997. 22(1-2):269-285.
128. Yeh LH, Park YJ, Hansalia RJ, Ahmed IS, Deshpande SS, Goldschmidt-Clermont PJ, Irani K, Alevriadou BR. **Shear-induced tyrosine phosphorylation in endothelial cells requires Rac1-dependent production of ROS.** *Am J Physiol* 1999. 276(4 Pt 1):C838-C847.
129. Sun Y, Oberley LW. **Redox regulation of transcriptional activators.** *Free Radic Biol Med* 1996. 21(3):335-348.
130. Monteiro HP, Stern A. **Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways.** *Free Radic Biol Med* 1996. 21(3):323-333.
131. Rhee SG. **Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger.** *Exp Mol Med* 1999. 31(2):53-59.
132. Thannickal VJ, Fanburg BL. **Reactive oxygen species in cell signaling.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000. 279(6):L1005-L1028.
133. Baas AS, Berk BC. **Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells.** *Circ Res* 1995. 77(1):29-36.
134. Clerk A, Fuller SJ, Michael A, Sugden PH. **Stimulation of "stress-regulated" mitogen-activated protein kinases (stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases) in perfused rat hearts by oxidative and other stresses.** *J Biol Chem* 1998. 273(13):7228-7234.

135. Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. **Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation.** *Biochem J* 1998. 335 (Pt 1):1-13.
136. Taher MM, Garcia JG, Natarajan V. **Hydroperoxide-induced diacylglycerol formation and protein kinase C activation in vascular endothelial cells.** *Arch Biochem Biophys* 1993. 303(2):260-266.
137. Nemani R, Lee EY. **Reactivity of sulfhydryl groups of the catalytic subunits of rabbit skeletal muscle protein phosphatases 1 and 2A.** *Arch Biochem Biophys* 1993. 300(1):24-29.
138. Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG. **Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor.** *J Biol Chem* 1998. 273(25):15366-15372.
139. Chakraborti T, Ghosh SK, Michael JR, Batabyal SK, Chakraborti S. **Targets of oxidative stress in cardiovascular system.** *Mol Cell Biochem* 1998. 187(1-2):1-10.
140. Dor Y, Porat R, Keshet E. **Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2001. 280(6):C1367-C1374.
141. Semenza GL. **Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders.** *Annu Rev Med* 2003. 54:17-28.
142. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. **Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing.** *J Biol Chem* 1995. 270(21):12607-12613.
143. Pertovaara L, Kaipainen A, Mustonen T, Orpava A, Ferrara N, Saksela O, Alitalo K. **Vascular endothelial growth factor is induced in response to transforming growth factor-beta in fibroblastic and epithelial cells.** *J Biol Chem* 1994. 269(9):6271-6274.
144. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, Donner DB. **Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma.** *J Biol Chem* 1996. 271(46):29483-29488.
145. Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL, Hla T. **Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis.** *FEBS Lett* 1995. 372(1):83-87.
146. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. **Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor.** *J Biol Chem* 1996. 271(2):736-741.
147. Shifren JL, Mesiano S, Taylor RN, Ferrara N, Jaffe RB. **Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells.** *J Clin Endocrinol Metab* 1998. 83(4):1342-1347.
148. Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, Meng YG, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY. **Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines.** *Surgery* 1996. 120(6):944-947.

149. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. **HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression.** *Mol Cell Biol* 2001. 21(12):3995-4004.
150. Spinella F, Rosano L, Di C, V, Natali PG, Bagnato A. **Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells.** *J Biol Chem* 2002. 277(31):27850-27855.
151. Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, Cohen B. **Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT.** *EMBO J* 1998. 17(17):5085-5094.
152. Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. **Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics.** *Cancer Res* 2000. 60(6):1541-1545.
153. Zagorska A, Dulak J. **HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing.** *Acta Biochim Pol* 2004. 51(3):563-585.
154. Gonzalez-Pacheco FR, Deudero JJ, Castellanos MC, Castilla MA, Alvarez-Arroyo MV, Yague S, Caramelo C. **Mechanisms of endothelial response to oxidative aggression: protective role of autologous VEGF and induction of VEGFR2 by H2O2.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006. 291(3):H1395-H1401.
155. Ushio-Fukai M. **Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase.** *Cardiovasc Res* 2006. 71(2):226-235.
156. Griguer CE, Oliva CR, Kelley EE, Giles GI, Lancaster JR, Jr., Gillespie GY. **Xanthine oxidase-dependent regulation of hypoxia-inducible factor in cancer cells.** *Cancer Res* 2006. 66(4):2257-2263.
157. Bell EL, Klimova TA, Eisenbart J, Schumacker PT, Chandel NS. **Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-inducible factor-dependent extension of the replicative life span during hypoxia.** *Mol Cell Biol* 2007. 27(16):5737-5745.
158. Zhao JP, Zhou ZG, Hu HL, Guo Z, Wang T, Zhen GH, Zhang ZX. **The relationships among reactive oxygen species, hypoxia-inducible factor 1alpha and cell proliferation in rat pulmonary arterial smooth muscle cells under hypoxia.** *Sheng Li Xue Bao* 2007. 59(3):319-324.
159. Zhang L, Li L, Liu H, Prabhakaran K, Zhang X, Borowitz JL, Isom GE. **HIF-1alpha activation by a redox-sensitive pathway mediates cyanide-induced BNIP3 upregulation and mitochondrial-dependent cell death.** *Free Radic Biol Med* 2007. 43(1):117-127.
160. Biswas S, Gupta MK, Chattopadhyay D, Mukhopadhyay CK. **Insulin-induced activation of hypoxia-inducible factor-1 requires generation of reactive oxygen species by NADPH oxidase.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007. 292(2):H758-H766.
161. Deudero JJ, Caramelo C, Castellanos MC, Neria F, Fernandez-Sanchez R, Calabia O, Peñate S, Gonzalez-Pacheco FR. **Induction of hypoxia-inducible factor 1alpha**

- gene expression by vascular endothelial growth factor. Role of a superoxide-mediated mechanism.** *J Biol Chem* 2008.
162. Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA. **Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer.** *Eur J Surg Oncol* 2004. 30(5):465-468.
 163. Kanno H, Kondo K, Ito S, Yamamoto I, Fujii S, Torigoe S, Sakai N, Hosaka M, Shuin T, Yao M. **Somatic mutations of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic central nervous system hemangioblastomas.** *Cancer Res* 1994. 54(18):4845-4847.
 164. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, Latif F, Liu S, Chen F, Duh FM, . **Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma.** *Nat Genet* 1994. 7(1):85-90.
 165. Choi HJ, Song BJ, Gong YD, Gwak WJ, Soh Y. **Rapid degradation of hypoxia-inducible factor-1alpha by KRH102053, a new activator of prolyl hydroxylase 2.** *Br J Pharmacol* 2008.
 166. Eckardt KU. **Anaemia in end-stage renal disease: pathophysiological considerations.** *Nephrol Dial Transplant* 2001. 16 Suppl 7:2-8.
 167. Wiesener MS, Seyfarth M, Warnecke C, Jurgensen JS, Rosenberger C, Morgan NV, Maher ER, Frei U, Eckardt KU. **Paraneoplastic erythrocytosis associated with an inactivating point mutation of the von Hippel-Lindau gene in a renal cell carcinoma.** *Blood* 2002. 99(10):3562-3565.
 168. Poellinger L, Johnson RS. **HIF-1 and hypoxic response: the plot thickens.** *Curr Opin Genet Dev* 2004. 14(1):81-85.
 169. Fink MP. **Pathophysiology of intensive care unit-acquired anemia.** *Crit Care* 2004. 8 Suppl 2:S9-10.
 170. Kakinuma Y, Miyauchi T, Yuki K, Murakoshi N, Goto K, Yamaguchi I. **Novel molecular mechanism of increased myocardial endothelin-1 expression in the failing heart involving the transcriptional factor hypoxia-inducible factor-1alpha induced for impaired myocardial energy metabolism.** *Circulation* 2001. 103(19):2387-2394.
 171. Schultz A, Lavie L, Hochberg I, Beyar R, Stone T, Skorecki K, Lavie P, Roguin A, Levy AP. **Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation.** *Circulation* 1999. 100(5):547-552.
 172. Li J, Post M, Volk R, Gao Y, Li M, Metais C, Sato K, Tsai J, Aird W, Rosenberg RD, Hampton TG, Sellke F, Carmeliet P, Simons M. **PR39, a peptide regulator of angiogenesis.** *Nat Med* 2000. 6(1):49-55.
 173. Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. **Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1.** *Am J Physiol* 1998. 274(2 Pt 1):L212-L219.
 174. Caramelo C, Justo S, Gil P. **[Anemia in heart failure: pathophysiology, pathogenesis, treatment, and incognitae].** *Rev Esp Cardiol* 2007. 60(8):848-860.

175. Bergeron M, Yu AY, Solway KE, Semenza GL, Sharp FR. **Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain.** *Eur J Neurosci* 1999. 11(12):4159-4170.
176. Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W. **Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia.** *Am J Pathol* 2000. 156(3):965-976.
177. Michaud SE, Menard C, Guy LG, Gennaro G, Rivard A. **Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke exposure: impairment of the HIF-1alpha/VEGF pathway.** *FASEB J* 2003. 17(9):1150-1152.
178. Chin BY, Jiang G, Wegiel B, Wang HJ, Macdonald T, Zhang XC, Gallo D, Cszimadia E, Bach FH, Lee PJ, Otterbein LE. **Hypoxia-inducible factor 1alpha stabilization by carbon monoxide results in cytoprotective preconditioning.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007. 104(12):5109-5114.
179. Vuorela P, Helske S, Hornig C, Alitalo K, Weich H, Halmesmaki E. **Amniotic fluid--soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in preeclampsia.** *Obstet Gynecol* 2000. 95(3):353-357.
180. Tazuke SI, Mazure NM, Sugawara J, Carland G, Faessen GH, Suen LF, Irwin JC, Powell DR, Giaccia AJ, Giudice LC. **Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. 95(17):10188-10193.
181. Ferrara N. **Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor.** *J Mol Med* 1999. 77(7):527-543.
182. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. **Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995. 92(3):905-909.
183. Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, Yamada H, Hackett SF, Okamoto N, Zack DJ, Semenza GL, Campochiaro PA. **Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999. 40(1):182-189.
184. Sen CK, Khanna S, Babior BM, Hunt TK, Ellison EC, Roy S. **Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing.** *J Biol Chem* 2002. 277(36):33284-33290.
185. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. **Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria.** *J Clin Invest* 1973. 52(11):2745-2756.
186. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. **Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1.** *Mol Cell Biol* 1996. 16(9):4604-4613.
187. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. **Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells.** *Nucleic Acids Res* 1989. 17(15):6419.

188. Royall JA, Ischiropoulos H. **Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells.** *Arch Biochem Biophys* 1993. 302(2):348-355.
189. Haugen TS, Skjonsberg OH, Kahler H, Lyberg T. **Production of oxidants in alveolar macrophages and blood leukocytes.** *Eur Respir J* 1999. 14(5):1100-1105.
190. Rothe G, Valet G. **Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein.** *J Leukoc Biol* 1990. 47(5):440-448.
191. Castilla MA, Neria F, Renedo G, Pereira DS, Gonzalez-Pacheco FR, Jimenez S, Tramon P, Deudero JJ, Alvarez-Arroyo MV, Yague S, Caramelo C. **Tumor-induced endothelial cell activation: role of vascular endothelial growth factor.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2004. 286(5):C1170-C1176.
192. Gorlach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, Berchner-Pfannschmidt U, Roth U, Brandes RP, Kietzmann T, Busse R. **Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase.** *Circ Res* 2001. 89(1):47-54.
193. Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. **Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1.** *Blood* 1999. 94(5):1561-1567.
194. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, Semenza GL. **Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2.** *Cancer Res* 1999. 59(16):3915-3918.
195. Haddad JJ, Land SC. **A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF-alpha-dependent regulation of HIF-1alpha.** *FEBS Lett* 2001. 505(2):269-274.
196. Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. **Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells.** *J Biol Chem* 2000. 275(35):26765-26771.
197. Ortega N, Hutchings H, Plouet J. **Signal relays in the VEGF system.** *Front Biosci* 1999. 4:D141-D152.
198. Obrig TG, Culp WJ, McKeehan WL, Hardesty B. **The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes.** *J Biol Chem* 1971. 246(1):174-181.
199. Caramelo C, Alvarez-Arroyo MV, Yague S, Suzuki Y, Castilla MA, Velasco L, Gonzalez-Pacheco FR, Tejedor A. **Cyclosporin A toxicity, and more: vascular endothelial growth factor (VEGF) steps forward.** *Nephrol Dial Transplant* 2004. 19(2):285-288.
200. Alvarez-Arroyo MV, Suzuki Y, Yague S, Lorz C, Jimenez S, Soto C, Barat A, Belda E, González-Pacheco FR, Deudero JJ, Castilla MA, Egido J, Ortiz A, Caramelo C. **Role of endogenous vascular endothelial growth factor in tubular cell protection against acute cyclosporine toxicity.** *Transplantation* 2002. 74(11):1618-1624.
201. Alvarez-Arroyo MV, Yague S, Wenger RM, Pereira DS, Jimenez S, González-Pacheco FR, Castilla MA, Deudero JJ, Caramelo C. **Cyclophilin-mediated pathways**

- in the effect of cyclosporin A on endothelial cells: role of vascular endothelial growth factor. *Circ Res* 2002. 91(3):202-209.
202. Yague S, Alvarez-Arroyo MV, Castilla A, Gonzalez-Pacheco FR, Llamas P, Caramelo C. **Modulation of the effect of vascular endothelial growth factor on endothelial cells by heparin: critical role of nitric oxide-mediated mechanisms.** *J Nephrol* 2005. 18(3):234-242.
203. Gonzalez-Pacheco FR, Caramelo C, Castilla MA, Deudero JJ, Arias J, Yague S, Jimenez S, Bragado R, Alvarez-Arroyo MV. **Mechanism of vascular smooth muscle cells activation by hydrogen peroxide: role of phospholipase C gamma.** *Nephrol Dial Transplant* 2002. 17(3):392-398.
204. Neria F, Caramelo C, Peinado H, Gonzalez-Pacheco FR, Deudero JJ, de Solis AJ, Fernandez-Sanchez R, Peñate S, Cano A, Castilla MA. **Mechanisms of endothelial cell protection by blockade of the JAK2 pathway.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2007. 292(3):C1123-C1131.
205. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. **Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells.** *J Biol Chem* 2002. 277(41):38205-38211.
206. Tacchini L, Dansi P, Matteucci E, Desiderio MA. **Hepatocyte growth factor signalling stimulates hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) activity in HepG2 hepatoma cells.** *Carcinogenesis* 2001. 22(9):1363-1371.
207. Alvarez-Arroyo MV, Castilla MA, González-Pacheco FR, Tan D, Riesco A, Casado S, Caramelo C. **Role of vascular endothelial growth factor on erythropoietin-related endothelial cell proliferation.** *J Am Soc Nephrol* 1998. 9(11):1998-2004.
208. Chatterjee PK. **Pleiotropic renal actions of erythropoietin.** *Lancet* 2005. 365(9474):1890-1892.
209. Zachary I. **Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2001. 280(6):C1375-C1386.
210. Fisher JW. **Erythropoietin: physiology and pharmacology update.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2003. 228(1):1-14.
211. Das B, Yeger H, Tsuchida R, Torkin R, Gee MF, Thorner PS, Shibuya M, Malkin D, Baruchel S. **A hypoxia-driven vascular endothelial growth factor/Flt1 autocrine loop interacts with hypoxia-inducible factor-1alpha through mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neuroblastoma.** *Cancer Res* 2005. 65(16):7267-7275.
212. Wang ES, Teruya-Feldstein J, Wu Y, Zhu Z, Hicklin DJ, Moore MA. **Targeting autocrine and paracrine VEGF receptor pathways inhibits human lymphoma xenografts in vivo.** *Blood* 2004. 104(9):2893-2902.
213. Steiner HH, Karcher S, Mueller MM, Nalbantis E, Kunze S, Herold-Mende C. **Autocrine pathways of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in**

- glioblastoma multiforme: clinical relevance of radiation-induced increase of VEGF levels.** *J Neurooncol* 2004. 66(1-2):129-138.
214. Feliers D, Gorin Y, Ghosh-Choudhury G, Abboud HE, Kasinath BS. **Angiotensin II stimulation of VEGF mRNA translation requires production of reactive oxygen species.** *Am J Physiol Renal Physiol* 2006. 290(4):F927-F936.
 215. Zhou MS, Hernandez S, I, Pagano PJ, Jaimes EA, Raj L. **Reduced NAD(P)H oxidase in low renin hypertension: link among angiotensin II, atherogenesis, and blood pressure.** *Hypertension* 2006. 47(1):81-86.
 216. Milovanova T, Chatterjee S, Manevich Y, Kotelnikova I, Debolt K, Madesh M, Moore JS, Fisher AB. **Lung endothelial cell proliferation with decreased shear stress is mediated by reactive oxygen species.** *Am J Physiol Cell Physiol* 2006. 290(1):C66-C76.
 217. Castier Y, Brandes RP, Leseche G, Tedgui A, Lehoux S. **p47phox-dependent NADPH oxidase regulates flow-induced vascular remodeling.** *Circ Res* 2005. 97(6):533-540.
 218. Gross ER, LaDisa JF, Weihrauch D, Olson LE, Kress TT, Hettrick DA, Pagel PS, Warltier DC, Kersten JR. **Reactive oxygen species modulate coronary wall shear stress and endothelial function during hyperglycemia.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003. 284(5):H1552-H1559.
 219. Tai LK, Okuda M, Abe J, Yan C, Berk BC. **Fluid shear stress activates proline-rich tyrosine kinase via reactive oxygen species-dependent pathway.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002. 22(11):1790-1796.
 220. Chiu JJ, Wung BS, Shyy JY, Hsieh HJ, Wang DL. **Reactive oxygen species are involved in shear stress-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997. 17(12):3570-3577.
 221. Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT. **Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing.** *J Biol Chem* 2000. 275(33):25130-25138.
 222. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. **Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. 95(20):11715-11720.
 223. Liu Y, Christou H, Morita T, Laughner E, Semenza GL, Kourembanas S. **Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5' enhancer.** *J Biol Chem* 1998. 273(24):15257-15262.
 224. Kimura H, Weisz A, Kurashima Y, Hashimoto K, Ogura T, D'Acquisto F, Addeo R, Makuuchi M, Esumi H. **Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide.** *Blood* 2000. 95(1):189-197.

225. Huang LE, Willmore WG, Gu J, Goldberg MA, Bunn HF. **Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling.** *J Biol Chem* 1999. 274(13):9038-9044.
226. Sogawa K, Numayama-Tsuruta K, Ema M, Abe M, Abe H, Fujii-Kuriyama Y. **Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. 95(13):7368-7373.
227. Quintero M, Brennan PA, Thomas GJ, Moncada S. **Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha in cancer: role of free radical formation.** *Cancer Res* 2006. 66(2):770-774.
228. Sandau KB, Fandrey J, Brune B. **Accumulation of HIF-1alpha under the influence of nitric oxide.** *Blood* 2001. 97(4):1009-1015.
229. Bonello S, Zahringer C, BelAiba RS, Djordjevic T, Hess J, Michiels C, Kietzmann T, Grolach A. **Reactive oxygen species activate the HIF-1alpha promoter via a functional NFkappaB site.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007. 27(4):755-761.
230. Zhou Q, Liu LZ, Fu B, Hu X, Shi X, Fang J, Jiang BH. **Reactive oxygen species regulate insulin-induced VEGF and HIF-1alpha expression through the activation of p70S6K1 in human prostate cancer cells.** *Carcinogenesis* 2007. 28(1):28-37.
231. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. **Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review).** *Free Radic Res Commun* 1992. 17(4):221-237.
232. Beckman JS, Koppenol WH. **Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.** *Am J Physiol* 1996. 271(5 Pt 1):C1424-C1437.
233. Suda O, Smith LA, d'Uscio LV, Peterson TE, Katusic ZS. **In vivo expression of recombinant vascular endothelial growth factor in rabbit carotid artery increases production of superoxide anion.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005. 25(3):506-511.
234. Abid MR, Schoots IG, Spokes KC, Wu SQ, Mawhinney C, Aird WC. **Vascular endothelial growth factor-mediated induction of manganese superoxide dismutase occurs through redox-dependent regulation of forkhead and IkappaB/NF-kappaB.** *J Biol Chem* 2004. 279(42):44030-44038.
235. Tzima E. **Role of small GTPases in endothelial cytoskeletal dynamics and the shear stress response.** *Circ Res* 2006. 98(2):176-185.
236. Al-Shabraway M, Bartoli M, El-Remessy AB, Platt DH, Matragoon S, Behzadian MA, Caldwell RW, Caldwell RB. **Inhibition of NAD(P)H oxidase activity blocks vascular endothelial growth factor overexpression and neovascularization during ischemic retinopathy.** *Am J Pathol* 2005. 167(2):599-607.
237. Ferrara N. **Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress.** *Endocr Rev* 2004. 25(4):581-611.
238. Semenza GL, Agani F, Booth G, Forsythe J, Iyer N, Jiang BH, Leung S, Roe R, Wiener C, Yu A. **Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1.** *Kidney Int* 1997. 51(2):553-555.

239. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griending KK. **p38 Mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II. Role in vascular smooth muscle cell hypertrophy.** *J Biol Chem* 1998. 273(24):15022-15029.
240. Wu JC, Yan HC, Chen WT, Chen WH, Wang CJ, Chi YC, Kao WY. **JNK signaling pathway is required for bFGF-mediated surface cadherin downregulation on HUVEC.** *Exp Cell Res* 2008. 314(3):421-429.
241. Matsumoto M, Sudo T, Saito T, Osada H, Tsujimoto M. **Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL).** *J Biol Chem* 2000. 275(40):31155-31161.
242. Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariati S, Cohen P, Comb MJ. **FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2.** *EMBO J* 1996. 15(17):4629-4642.
243. Kyriakis JM, Avruch J. **Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation.** *Physiol Rev* 2001. 81(2):807-869.
244. Leppa S, Bohmann D. **Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis.** *Oncogene* 1999. 18(45):6158-6162.
245. Duyndam MC, Hulscher ST, van der WE, Pinedo HM, Boven E. **Evidence for a role of p38 kinase in hypoxia-inducible factor 1-independent induction of vascular endothelial growth factor expression by sodium arsenite.** *J Biol Chem* 2003. 278(9):6885-6895.
246. Morley SJ, McKendrick L. **Involvement of stress-activated protein kinase and p38/RK mitogen-activated protein kinase signaling pathways in the enhanced phosphorylation of initiation factor 4E in NIH 3T3 cells.** *J Biol Chem* 1997. 272(28):17887-17893.
247. Conrad PW, Rust RT, Han J, Millhorn DE, Beitner-Johnson D. **Selective activation of p38alpha and p38gamma by hypoxia. Role in regulation of cyclin D1 by hypoxia in PC12 cells.** *J Biol Chem* 1999. 274(33):23570-23576.
248. Harris AL. **Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth.** *Nat Rev Cancer* 2002. 2(1):38-47.
249. Mukhopadhyay D, Datta K. **Multiple regulatory pathways of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in tumors.** *Semin Cancer Biol* 2004. 14(2):123-130.



8. Artículos publicados

RESPUESTA A LA HIPOXIA.

UN MECANISMO SISTEMICO BASADO EN EL CONTROL DE LA EXPRESION GENICA

**CARLOS CAMELO, JUAN J. PEÑA DEUDERO, ANGELES CASTILLA, SOLEDAD JUSTO,
ALAIN J. DE SOLIS, FERNANDO NERIA, SILVIA PEÑATE, FRANCISCO R. GONZALEZ-PACHECO**

*Laboratorio de Nefrología e Hipertensión, Instituto de Investigaciones Médicas,
Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid*

Resumen La respuesta hipóxica, sobre la que se dispone de nuevos datos críticamente importantes, puede esquematizarse en tres sistemas, *vg.* de detección o sensor de oxígeno, de regulación, que controla la expresión génica y efector. El elemento principal de organización del sistema regulador es un factor de transcripción específico, el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1). En presencia de oxígeno, la subunidad α del HIF-1 (HIF-1 α) se modifica por las hidroxilasas, que constituyen el punto central del mecanismo sensor, induciendo su catabolismo por el proteosoma. Por el contrario, en hipoxia, o en presencia de algunos factores de crecimiento que incrementan su síntesis, el HIF-1 α se transloca al núcleo, donde, unido al HIF-1 β , actúa como factor transcripcional de genes con elementos de respuesta hipóxica (HRE) en su promotor. Estos regulan la síntesis de una amplia serie de proteínas, que abarcan desde enzimas respiratorias y transportadores hasta hormonas involucradas en la regulación a escala del organismo de la circulación y la eritropoyesis. El papel del HIF-1 no se restringe a la mera inducción de una respuesta adaptativa a la falta de oxígeno, sino que participa significativamente en los mecanismos de reparación celular. Una simple lista de algunas alteraciones de importancia fisiopatológica, tanto estimuladoras como inhibitorias, que involucran al sistema de HIF-1, incluiría: enfermedad pulmonar crónica, adaptación al tabaco/humo, anemia/hemorragia, isquemia/reperfusión, crecimiento, vascularización y resistencia celular de los tumores, preeclampsia y crecimiento intrauterino retardado, hiper o hipovascularización retiniana, sobredosis de fármacos, enfermedad inflamatoria intestinal y curación de heridas. Esta sola enumeración ilustra la importancia de este mecanismo.

Palabras clave: hipoxia, HIF-1, sensor de oxígeno, VEGF, eritropoyetina

Abstract *Response to hypoxia. A systemic mechanism based on the control of gene expression.* New, critically important data have been recently generated about the response to hypoxia. This response can be schematized in three main systems or functions, *ie.* detectional or oxygen sensing, regulatory, which controls gene expression and effector. The principal organizer of the regulatory branch is a specific transcription factor, the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). In the presence of oxygen, the α subunit of HIF-1 (HIF-1 α) is modified by hydroxylases, that represent the central point of the oxygen sensing mechanism. This type of hydroxylation induces HIF-1 α catabolism by the proteasome. On the contrary, in hypoxia, or in the presence of certain growth factors that increase HIF-1 α synthesis, HIF-1 α translocates to the nucleus, where it binds HIF-1 β , and thence acts on transcription of genes carrying hypoxia responsive elements (HRE) on their promoters. These genes regulate the synthesis of an ample series of proteins, which span from respiratory enzymes and transporters to hormones regulating circulation and erythropoiesis. The role of HIF-1 α is not restricted to the mere induction of adaptation to decreased oxygen: instead, it significantly participates in cell repairing mechanisms. A simple list of some of the stimulatory or inhibitory alterations of pathophysiological importance involving the HIF-1 system, would include: chronic lung disease, smoking adaptation, anemia/hemorrhage, ischemia/reperfusion, growth, vascularization and cell resistance of tumors, preeclampsia and intrauterine growth retardation, retinal hyper or hypovascularization, drug intoxications, bowel inflammatory disease and wound repair. This list illustrates by itself the importance of the mechanism herein reviewed.

Key words: hypoxia, HIF-1, oxygen sensor, VEGF, erythropoietin

La fisiopatología es un territorio de límites imprecisos, que tiene como denominador común la adaptación a la enfermedad de mecanismos que, en su origen, se desarrollaron para responder a situaciones de especial exigencia en individuos sanos. Así, entre otras, el organismo enfermo emplea respuestas sistémicas primarias ante la agresión, como las que se desencadenan ante la pérdida de sangre, la infección, los traumatismos, la deshidratación, el ayuno, o la hipoxia, para hacer frente a situaciones patológicas. Estas últimas, especialmente las crónicas, son sustancialmente diferentes de la condición original a la que se aplica el mecanismo de respuesta. Valgan como ejemplos característicos de esta dualidad los siguientes: uno, la estimulación del eje renina-angiotensina-aldosterona incluye aspectos inflamatorios y promotores de la cicatrización vascular, que son útiles en el caso de la herida de un vaso, pero resultan deletéreos en la arteriosclerosis crónica; otro, el remodelado vascular pulmonar inducido por la hipoxia es necesario y favorable en la adaptación fisiológica a la altitud, pero actúa negativamente en un paciente con enfermedad pulmonar crónica. La hipoxia es un prototipo considerablemente bien estudiado y un paradigma de respuestas que involucran al organismo en su conjunto y pueden tener consecuencias diferentes en la salud y en la enfermedad.

Hipoxia: Una pregunta inmediata a realizarse es qué condiciones fisiopatológicas se asocian con hipoxia. Existe hipoxia transitoria durante el ejercicio, en sepsis o en tejidos traumatizados e hipoxia crónica en la altura o en zonas tisulares menos oxigenadas, como por ejemplo la médula renal. Ya en el terreno de la patología, hay hipoxia en la enfermedad pulmonar, la insuficiencia cardíaca, la isquemia tisular, la anemia y en los tejidos tumorales.

La respuesta a la hipoxia puede esquematizarse en tres sistemas: a) de detección o sensor de oxígeno, b) de regulación, mediante el control de la expresión de una amplia serie de genes, y c) efector múltiple, que incluye no sólo expresión de genes, sino múltiples cambios funcionales, que van desde la estimulación de moléculas vasodilatadoras hasta las variaciones en la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno. El sistema regulador está modulado directamente por el sensor y el elemento organizador principal es un factor de transcripción específico, el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1). La presente revisión se centra específicamente en este factor.

Respuesta a la hipoxia: La diferencia entre los tejidos y órganos no proviene de su dotación génica, sino de la manifestación particular de los genes en cada tipo celular. En este contexto, los factores de transcripción actúan para orientar y adaptar, o dicho más gráficamente, reclutar la expresión génica hacia patrones determinados de respuesta, como por ejemplo la supervivencia, la migración, la proliferación o el crecimiento.

La respuesta a la hipoxia requiere un alto nivel de coordinación. Su mecanismo incluye un espectro de cambios que van desde variaciones en la expresión enzimática que adaptan la producción de energía frente a una menor disponibilidad de oxígeno, hasta la puesta en marcha de fenómenos de autoeliminación de la célula ante la imposibilidad de sobrevivir en circunstancias adversas extremas. Todos los organismos, desde las bacterias hasta los humanos, poseen mecanismos para el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno, que son esenciales para la producción energética y por lo tanto para la supervivencia. En los mamíferos superiores, la respuesta a la hipoxia es compleja, e incluye, entre otras, adaptaciones de la función respiratoria y hemodinámica, del metabolismo intermedio y de la función renal. Estas adaptaciones se manifiestan en cambios hormonales, de mediadores y de actividad enzimática, e implican variaciones en la expresión de una serie de genes entre los que destacaremos el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la eritropoyetina (EPO).

El incremento en la expresión de VEGF en condiciones de hipoxia ocurre a través de mecanismos moleculares de aumento de transcripción¹ y/o estabilización del ARNm². La regulación transcripcional del VEGF en condiciones de hipoxia está mediada por la unión de HIF-1 a secuencias específicas localizadas en el promotor del VEGF (HIF-1 *binding sites* – HBSs o *hypoxia responsive elements*, HREs), constituida por las bases: -RCGTG⁻³. La regulación de la expresión de EPO es similar a la referida para VEGF en lo que concierne al papel del HIF-1, pero diferente en cuanto a otros elementos co-reguladores con efectos sobre el promotor.

El factor inducible por hipoxia (HIF-1): HIF-1 es un heterodímero compuesto por dos sub-unidades (HIF-1 α y HIF-1 β) con pesos moleculares aparentes de 120-130 kD y 91-94 kD⁴, respectivamente. Ambas sub-unidades comparten cierta homología en sus extremos N-terminales, conteniendo un dominio bHLH (*basic helix-loop-helix*) y un dominio PAS (Per-Arnt-Sim), que están involucrados en la dimerización y en la unión al ADN⁵. El extremo COOH-terminal de la sub-unidad α contiene dos dominios de transactivación (TADs) y un dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD), siendo éstos los responsables de las funciones transactivadora y reguladora de este factor en diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno⁶. HIF-1 β es idéntico al ARNT –translocador nuclear del receptor Ah (aril hydrocarbon)–. Esta proteína dimeriza con receptores Ah activados cuyos ligandos constituyen diferentes contaminantes ambientales, como aminas heterocíclicas, hidrocarburos aromáticos y compuestos aromáticos (dioxinas, dibenzofuranos y bifenilos)⁷. La identificación de ARNT como sub-unidad de HIF-1 demostró por vez primera que ARNT (HIF-1 β) constituye una sub-unidad común de varios

heterodímeros que contienen dominios bHLH. La translocación al núcleo de HIF-1 α y heterodimerización con HIF-1 β son necesarias para la unión de HIF-1 a los HBSs y su consiguiente transactivación.

El descubrimiento de HIF-1 como factor regulador de la homeostasis del O₂ surgió como consecuencia del estudio de los mecanismos moleculares que modulaban la transcripción de la EPO en respuesta a la hipoxia³. La caracterización de los niveles de expresión de HIF-1 α y HIF-1 β , se evaluó inicialmente en células Hep3B y HeLa bajo diferentes condiciones de disponibilidad de O₂—hipoxia, normoxia y re-oxigenación—⁸. De manera general el ARNm de ambas sub-unidades se expresaba constitutivamente bajo cualquier condición. Sin embargo, la proteína de HIF-1 α sólo era detectable en hipoxia.

En presencia de oxígeno, HIF-1 α sufre modificaciones post-traduccionales por parte de hidroxilasas (PHD1-3, FIH-1), las cuales hidroxilan residuos de Pro^{402/564} y de Asn⁸⁰³ que se localizan en los dominios ODD y TADs, respectivamente^{9, 10}. Estas modificaciones permiten la unión de la proteína VHL (von Hippel Lindau) a los sitios hidroxilados de HIF-1 α formando parte del complejo E3 ubiquitin-ligasa, provocando así su ubiquitinación y degradación¹¹. La hidroxilación del residuo Asn⁸⁰³ se ha descrito recientemente y constituye un impedimento estérico en la unión del co-activador CBP/p300 a HIF-1 α , necesario para la transactivación de HIF-1¹⁰. En ausencia de oxígeno, HIF-1 α es fosforilado y translocado al núcleo, donde dimeriza con HIF-1 β y se acopla a su co-activador CBP/p300, permitiendo la transactivación e inducción de genes (Fig. 1). Es importante también, aunque está menos caracterizada, la unión de HIF-1 a proteínas de estrés (HSPs)¹². Esta unión protege a HIF-1 de la degradación. En este sentido, el efecto pro-degradativo de HIF-1 de agentes del tipo de las ansamicinas, bloqueantes de HSP90, abre una posibilidad de interés en el campo terapéutico de la antiangiogénesis¹³.

El sensor de oxígeno: Desde hace décadas, se ha trabajado en la identificación del sensor de oxígeno, en general bajo el supuesto de que se trataría de una proteína con un grupo hemo o similar¹⁴. En los últimos años, se han hecho avances notables en el conocimiento del mecanismo de este sensor, basadas en su propiedad de activar la señalización vía HIF-1. Existen varios modelos que involucran a diferentes moléculas como responsables de dicha función; entre ellas es fundamental un tipo especial de hidroxilasas (PHDs) que utilizan 2-cetoglutarato como sustrato, y que al ser reguladas por oxígeno, cumplen todas las premisas para ser consideradas como el sensor principal de oxígeno. En la estructura de estas proteínas es característico un grupo prostético de tipo hemo, en el cual el Fe²⁺ puede ser sustituido por otros metales (Co²⁺, Ni²⁺) causando un bloqueo en la capacidad hidroxilasa de la enzima y por lo tanto una inhibición de la degradación de HIF-1 α ¹⁵. Un segundo tipo

de regulación atribuye a las especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente el superóxido (O₂⁻) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), un papel modulador importante. Este papel se ejerce de dos maneras distintas. En un caso, la enzima NADPH oxidasa (O₂ → O₂⁻) es la responsable de la producción de ROS, que en condiciones de normoxia inducen la degradación de HIF-1 α . Una segunda situación señala que la producción de ROS en la mitocondria (cyt c1 → O₂⁻ → H₂O₂) en condiciones de hipoxia induce la estabilización de HIF-1 α ¹⁶. Los mecanismos celulares de ambas formas de regulación están aún pendientes de resolver.

Otras vías de estimulación de HIF-1: La hipoxia no es el único estímulo que incrementa los niveles de HIF-1 α . En condiciones de normoxia muchas citoquinas y factores de crecimiento activadores de receptores del tipo tirosina quinasa (RTKs) son también capaces de inducir HIF-1 α , repercutiendo sobre un incremento en los niveles de este factor transcripcional. Entre éstos se incluyen: insulina¹⁷, factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2)¹⁸, interleuquina-1 β (IL-1 β)¹⁹, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)¹⁹, factor de crecimiento epidérmico (EGF)²⁰, trombina²¹, endotelina 1 (ET-1)²² y heregulina (HER2)²³. De manera general, el mecanismo por el cual todos ellos inducen HIF-1 α incluye un incremento en la síntesis de la proteína, a diferencia de lo que ocurre en hipoxia, en la que la estabilidad del factor está asociada a una disminución en su tasa de degradación. Las vías principales de señalización descritas hasta el momento que participan en la inducción de HIF-1 α a partir de estos factores de crecimiento, incluyen PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa), Akt (PKB), Ras, MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), y MEK (quinasa de MAPK) (Fig. 2). En el corriente año académico, y en el curso de trabajos enfocados al efecto del estrés oxidativo sobre las células endoteliales, hemos obtenido resultados que sugieren la existencia de una vía de retroalimentación del VEGF sobre su propio factor de transcripción principal, el HIF-1^{24, 25}. Un aspecto novedoso adicional de esta vía es el papel del anión superóxido como mediador principal de transmisión de la señal activadora. En cuanto al posible significado funcional de esta vía, pueden postularse la sensibilización a la respuesta hipóxica a través de uno de sus productos intermedios y la amplificación de los efectos de factores de crecimiento a través del reclutamiento de genes dependientes de HIF-1. En este último sentido, puede considerarse, por ejemplo, que el efecto inductor de HIF-1 sobre las vías glucolíticas puede ser crítico a la hora de la oferta de energía y metabolitos intermediarios necesarios para la proliferación.

Expresión génica en la hipoxia: Tal como hemos mencionado, la respuesta a la hipoxia es integral, y abarca todos los aspectos necesarios para proveer oxígeno a los tejidos y conseguir su aprovechamiento más eficaz.

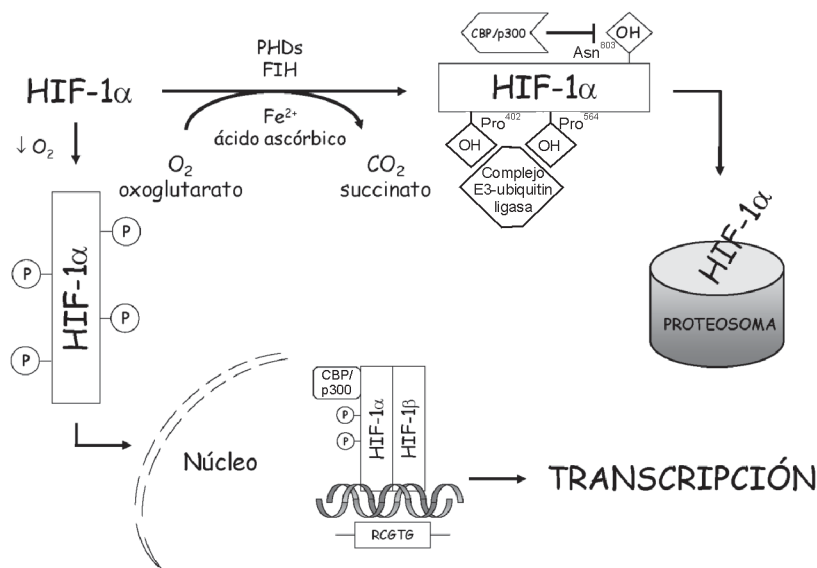


Fig. 1.— Ciclo de activación-degradación de HIF-1 α . A la izquierda se muestra el funcionamiento en hipoxia y a la derecha en normoxia. Abreviaturas: **Asn**, asparagina; **CBP/p300**, complejo coactivador transcripcional CREB-binding protein/p300; **FIH**, factor inhibidor de HIF; **HIF-1 α** , subunidad α del factor inducible por hipoxia; **OH**, sitios de hidroxilación; **P**, sitios de fosforilación; **PHDs**, prolin hidroxilasas; **Pro**, prolina.

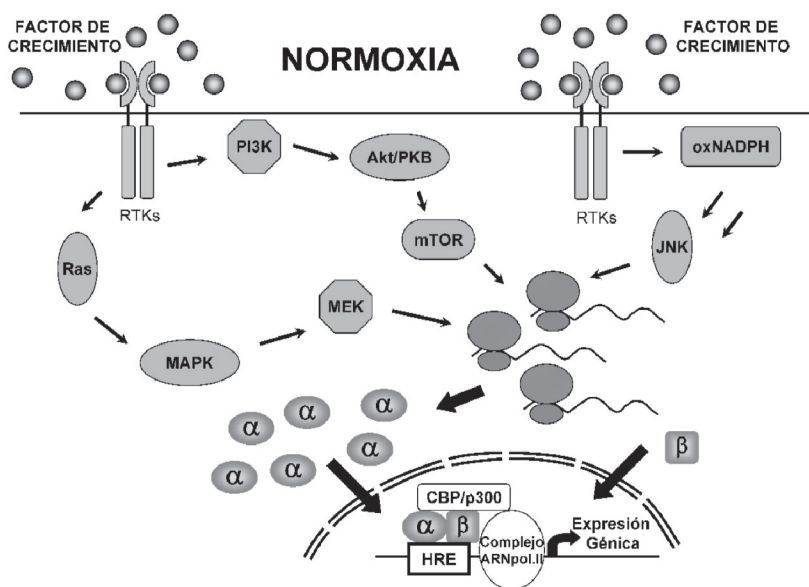


Fig. 2.— Mecanismo común de inducción de HIF-1 α por citoquinas y/o factores de crecimiento. Abreviaturas: **Akt/PKB**, proteína quinasa B; **CBP/p300**, CREB-binding protein/p300; **HRE**, hipoxia-responsive element; **JNK**, c-jun N-terminal kinase; **MAPK**, mitogen-activated protein kinase; **MEK**, MAPK kinase; **mTOR**, mammalian target of rapamycin; **oxNADPH**, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase; **PI3K**, phosphatidylinositol 3-OH kinase; **Ras**, small G protein; α , subunidad α del factor inducible por hipoxia; β , subunidad β del factor inducible por hipoxia.

En la actualidad, la identificación de genes que se activan por HIF-1 se ha incrementado considerablemente, incluyendo muchos cuyas proteínas participan en múltiples funciones celulares dirigidas a favorecer la oxi-

genación tisular, entre otras, angiogénesis, metabolismo energético, eritropoyesis, proliferación y viabilidad celular, remodelado vascular y apoptosis. La Figura 3 esquematiza los genes que se ponen en marcha a tra-

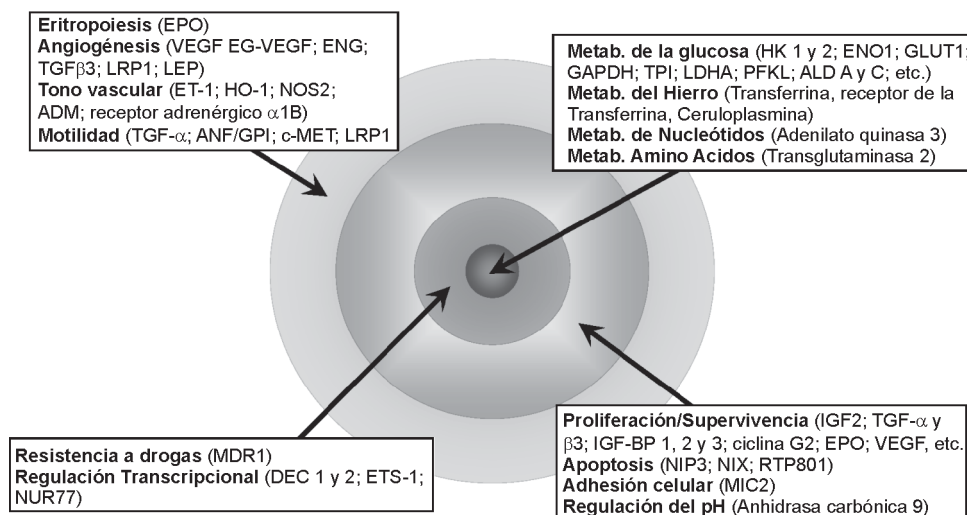


Fig. 3.— Genes transactivados por HIF-1. La distribución concéntrica se ha empleado a los fines de visualizar la participación de genes ligados a adaptaciones celulares esenciales a la hipoxia (centro) y mecanismos con diferente grado de integración sistémica (periferia). Abreviaturas: **ADM**, adrenomedullin; **ALD A y C**, aldolase A and C; **EG-VEGF**, endocrine-gland-derived VEGF; **ENG**, endoglin; **ET1**, endothelin 1; **ENO1**, enolase 1; **EPO**, erythropoietin; **GLUT1**, glucose transporter 1; **GAPDH**, glyceraldehyde-3-p-dehydrogenase; **HK 1 y 2**, hexokinase 1 and 2; **IGF2**, insulin-like growth factor 2; **IGF-BP 1, 2 y 3**, IGF-factor-binding-protein 1, 2 and 3; **LDHA**, lactate dehydrogenase A; **LEP**, leptin; **LRP1**, LDL-receptor-related protein 1; **MDR1**, multidrug resistance 1; **NOS2**, nitric oxide synthase 2; **PFKL**, phosphofructokinase; **TGF-α**, transforming growth factor-α; **TGF-β3**, transforming growth factor-β3; **TPI**, triosephosphate isomerase, **VEGF**, vascular endothelial growth factor.

vés de HIF-1. La inducción vía HIF-1 afecta a factores de citoprotección, destinados a amortiguar el daño hipóxico^{1, 26} y enzimas glucolíticas^{27, 28} y de transporte de hexosas²⁹, necesarias para la adaptación metabólica inmediata y producción de ATP por vías anaerobias; también, se activan genes de mediadores hemodinámicos^{22, 30}, destinados a mantener la perfusión tisular; a nivel de organismo, se inducen genes de más largo alcance e integradores, enfocados a la angiogénesis^{1, 31}, al trofismo vascular²⁶ y a la producción de transportadores de oxígeno, incluyendo hematies^{8, 32}. Un dato importante de interpretación es que, si bien el HIF-1 ejerce el papel principal en la inducción de estos genes, necesita elementos co-reguladores, cuyos sitios de unión al promotor se distribuyen en el flanco del HRE donde se une el HIF-1, incrementando su respuesta e incluso haciendo posible la transcripción, que no ocurre en su ausencia. Un ejemplo típico de esta circunstancia es el estímulo por hipoxia de la expresión del gen de ET-1, que necesita de la acción mancomunada de HIF-1, AP-1, GATA-2, y CAAT-binding factor (NF-1)³³.

HIF-1, hipoxia y citoprotección: Sintetizando estos apartados, la respuesta de HIF-1 es específica de la hipoxia y del estímulo por factores de crecimiento. Esta última vía se relaciona con la necesidad de proveer una

mayor oferta de oxígeno en tejidos en expansión celular. En este punto cabe preguntarse si la célula responde a la depleción energética de forma idéntica a la falta de oxígeno. Los datos disponibles, si bien todavía insuficientes, indican que el déficit de ATP, que podría ser interpretado como un equivalente de hipoxia, no parece estimular la activación de HIF-1, aunque sí en cambio la de HSPs^{34, 35}. De interés adicional, en modelos experimentales en células tubulares renales (LLC-PK1), la hipoxia no extrema no causa depleción de ATP, un dato que refleja la eficiente adaptación de la producción energética ante la disminución de oxígeno³⁴. No se han publicado aún estudios similares en modelos con bloqueo de HIF-1, pero su interés es obvio, ya que es probable que HIF-1 sea en gran parte responsable de la citada eficiencia.

Estos datos se relacionan con el apartado final, referido a posibilidades terapéuticas. En breve, las acciones citoprotectoras abarcan a muchos tipos celulares y respuestas sistémicas. En este contexto, HIF-1 es un factor transcripcional clave en una respuesta génica compleja, desarrollada a múltiples niveles. A modo de ejemplos, en experimentos en ratón, se ha observado que episodios breves de hipoxia intermitente bastan para inducir la producción de EPO, que a su vez protege al corazón

del daño apoptótico por isquemia-reperfusión; por el contrario, en animales que no expresan HIF-1, esta respuesta no ocurre, no estimulándose la producción de EPO con la hipoxia³⁶. En diferentes tipos tumorales, HIF-1 se encuentra marcadamente activado, y este estado se relaciona con mayor agresividad del tumor. Más aún, otra posible explicación, más indirecta, de los efectos de HIF-1 sobre los tumores proviene de datos recientes, que demuestran una elevación de HIF-1, con efectos protectores, en las células endoteliales de tumores irradiados, lo que aporta un nuevo abordaje de interpretación a los posibles mecanismos de resistencia tumoral a la radioterapia³⁷.

Aspectos clínicos: La expresión de HIF-1 y los genes que regula, se han relacionado con múltiples circunstancias ambientales y fisiológicas (altura, ejercicio, frío, exposición al tabaco), como procesos patológicos. Hemos seleccionado algunas situaciones de interés inmediato.

Enfermedad pulmonar crónica: En un ejemplo de adaptación fisiológica, en la altura se ha observado un aumento de expresión de HIF-1 tanto en nativos aclimatados crónicamente como en viajeros; este aumento se acompaña de incremento de EPO y cambios en el músculo esquelético, y especialmente en el número y actividad de mitocondrias³⁸. Este aumento de HIF-1, que es útil para incrementar la capacidad transportadora de oxígeno, se acompaña de estimulación de mecanismos de remodelado de la vasculatura, que llevan a mayor hipertensión pulmonar. La hipoxia es un potente estímulo para la producción por el endotelio pulmonar de ET-1, un péptido capaz de inducir vasoconstricción y proliferación del músculo liso de los vasos pulmonares y VEGF, un agente proliferativo y remodelante; ambos genes están relacionados con HIF-1. En contrapartida fisiológica, ET-1 aumenta en la altitud de forma inversamente proporcional a la saturación arterial de oxígeno y de manera directamente proporcional con el aumento en la presión sistólica de la arteria pulmonar³⁹. Es de interés el estudio del papel de genes dependientes de HIF-1 en otros mecanismos relacionados con la hipertensión pulmonar, como la inhibición del canal de potasio en los vasos pulmonares, así como en la activación local de angiotensina II³⁹. En la misma línea de evidencia, el síndrome de apnea obstructiva del sueño se acompaña de niveles elevados de VEGF en sangre, en proporción al grado de hipoxia; este dato proporciona una pista en la dirección de un posible incremento de HIF-1 y por consiguiente de otros genes potencialmente relevantes⁴⁰.

El sistema de HIF-1 participa de la adaptación al ejercicio, y especialmente de los cambios hipóxicos relacionados con el mismo, favoreciendo el paso de la glucólisis aerobia a la anaerobia. En este sentido, en animales a los que se ha eliminado HIF-1, se observa ausencia de acumulación de ácido láctico durante el ejercicio, con disminución de la fatigabilidad y consiguiente uso mus-

cular excesivo y daño similar al encontrado en las distrofias musculares con alteración de la vía glucolítica⁴¹. De interés especial, la glucólisis anaerobia mantiene los niveles de ATP a pesar de la ausencia de producción aerobia de energía. Este fenómeno es especialmente importante en la isquemia/reperfusión, y depende de HIF-1 y sus genes relacionados.

Patología tumoral: El crecimiento rápido de los tumores determina que su incremento de tamaño no se acompañe de un desarrollo vascular suficiente, lo que genera zonas de hipoxia en el interior de la masa tumoral. Esta hipoxia activa HIF-1 y éste a su vez pone en marcha toda la familia de genes angiogénicos⁴², aumentando la densidad y permeabilidad vascular, y por tanto el crecimiento y propagación del tumor y, de gran interés, en algunos casos la resistencia del mismo al tratamiento. Independientemente de la hipoxia, en algunos tumores, como hemangioblastomas y carcinomas renales, la activación de HIF-1 se relaciona con la inactivación funcional del gen supresor VHL, lo que disminuye la degradación y aumenta el HIF-1, aun en normoxia^{43, 44}. Además, el hallazgo reciente de niveles altos de HIF-1 en neoplasias como la leucemia aguda linfática, en la que no existe aparentemente hipoxia, sugiere que la explicación del aumento debe ser más compleja⁴⁵.

Si bien el incremento de HIF-1 en los tumores es un hecho demostrado, no se han desarrollado aún abordajes terapéuticos basados en su bloqueo específico. Ahondando un poco más, se desconocen las causas de por qué, dentro de todos los genes dependientes de HIF-1, solo se expresan con mayor intensidad algunos, un fenómeno que debe estudiarse y que se relaciona con la presencia de sitios co-reguladores de los efectos de la unión del HIF-1 al HRE. Un aspecto de interés extremo es el posible papel de HIF-1 en la particular adaptación metabólica de los tumores, en los que la glucólisis anaerobia no se inhibe en presencia de formación de ATP por vía aeróbica; esta situación puede relacionarse en forma directa con el efecto protector del HIF-1 sobre las células tumorales.

Shock hemorrágico: En el shock hemorrágico, el HIF-1 se activa a nivel tisular, pero la información disponible es todavía muy fragmentaria. En este tipo de shock existe inducción de óxido nítrico sintasa (NOS), ciclooxigenasa 2 (COX-2) y CD14, lo que aumenta la producción de óxido nítrico (NO) y prostaglandinas. HIF-1 regula la inducción de NOS durante la fase isquémica de este shock^{46, 47}.

Anemia y eritropoyetina: HIF-1 es esencial en la inducción fisiológica del gen de EPO. Viendo esta relación desde el punto de vista del mecanismo global desarrollado anteriormente, es notable que HIF-1 actúe sobre al menos tres genes de importancia en cuanto al efecto de la EPO: el de la transferrina, necesario para la oferta de hierro a las células eritroides, el del VEGF, cofactor en la estimulación de estas mismas células y el de la NOS2, necesario para la producción de NO, que permite el

mantenimiento de cifras normales de presión arterial durante el efecto de la EPO, hasta el punto en que en ratones transgénicos para EPO humana, la inhibición de NOS provoca la muerte por complicaciones masivas cardiovasculares⁴⁸.

En patología, individuos con mutaciones estimuladoras de HIF-1 presentan policitemia familiar; del mismo modo, la eritrocitosis paraneoplásica se ha asociado a mutaciones del gen VHL que afectan su interacción con HIF-1⁴⁹. De especial interés, la EPO no solo tiene funciones como regulador de la eritropoyesis, sino que participa en diferentes mecanismos, entre otros la vascularización retiniana y de la glándula mamaria, diferenciación de adipocitos, maduración embrionaria de la cresta neural, citoprotección neuronal, de miocardiocitos y de túbulo renales en situaciones de isquemia/reperfusión⁵⁰.

El mecanismo exacto por el cual aumenta la EPO en la anemia humana no se ha dilucidado por completo; por ejemplo, en las Unidades de Cuidados Intensivos, los niveles de EPO pueden ser inapropiadamente bajos para el grado de anemia; las razones no se conocen suficientemente, pero la insuficiencia renal es probablemente un elemento significativo. En nuestro conocimiento, se carece de estudios acerca del HIF-1 de pacientes de cuidados intensivos⁵¹.

Enfermedad cardíaca: En la insuficiencia cardíaca (IC), en un contexto parecido al que referimos en la enfermedad pulmonar crónica, existe aumento de ET-1, que si bien tiene un efecto inotrópico positivo, en el largo plazo favorece la hipertrofia miocárdica y la mala adaptación. En la isquemia miocárdica, se han detectado aumentos de VEGF, relacionados con estimulación hipóxica⁵². Los niveles de VEGF en leucocitos expuestos a hipoxia se correlacionan con el grado de formación de colaterales que induce la isquemia coronaria *in vivo*⁵³, por lo que una disminución de la expresión de HIF-1/VEGF inducidos por isquemia representaría un factor de riesgo no descrito previamente. En este sentido, es de prever que los desarrollos terapéuticos se dirigirán progresivamente a drogas que aumenten la activación de HIF-1 o inhiban su degradación, como por ejemplo el recientemente descrito PR39, péptido derivado de los macrófagos que induce angiogénesis miocárdica⁵⁴. Un segundo aspecto de interés es el del papel de HIF-1 en el pre-condicionamiento cardíaco ante la isquemia, en el que tiene un papel relevante la síntesis de nuevas proteínas en las primeras 24 h que siguen a un episodio agudo, con particular referencia a la NOS2 en miocardiocitos y células endoteliales⁵⁵. El HIF-1 es esencial en esta inducción.

La anemia es un factor patogénico relevante en la IC, cuyo origen está aún incompletamente dilucidado⁵⁶. La presencia de niveles elevados de EPO en pacientes con IC hace probable que HIF-1 esté estimulado, pero no se dispone aún de datos publicados en este sentido. Ac-

tualmente están en curso estudios, como el auspiciado por la Red Cardiovascular del Instituto de Salud Carlos III (Ministerio de Sanidad, España) acerca de la patogenia de la anemia en la IC, que incluye medidas de HIF-1, pero del que no se han comunicado aún resultados.

Ictus: En modelos de oclusión vascular en ratas, se ha visto un incremento de la expresión de ARNm de HIF-1 en la zona de penumbra o tejido viable circundante al infarto⁵⁷. Esto coincide con la expresión de ARNm de otros genes transactivados por HIF-1, como enzimas glucolíticas y VEGF, que promueven la supervivencia neuronal⁵⁸.

Tabaco/Humo: Algunos de los mecanismos de carcinogénesis mediada por los hidrocarburos policíclicos aromáticos, encontrados en el humo del tabaco y en la contaminación urbana, así como la de las dioxinas, depende de su unión al receptor aril hidrocarburo (AhR) y su dimerización con ARNT, proteína que también dimeriza con HIF-1 α ⁵. Por otra parte, la exposición al humo del tabaco reduce la angiogénesis inducida por hipoxia, disminuyendo la expresión de VEGF y HIF-1 α , a través de una desestabilización de HIF-1 α por el monóxido de carbono (CO) producido en la combustión del cigarrillo. Esta supresión de genes angiogénicos puede ser determinante en los efectos del tabaco sobre la microcirculación, habiéndose propuesto terapéuticas basadas en la administración de vectores portadores de VEGF⁵⁹. Sin embargo, en un estudio en curso (Deudero JJP y González-Pacheco FR, datos no publicados) no se han encontrado diferencias en la respuesta de HIF-1 α hasta una semana después de haberse interrumpido el uso del tabaco en fumadores de más de 20 cigarrillos diarios.

Preeclampsia y crecimiento intrauterino retardado: En la preeclampsia, existe un fallo primario del trofoblasto para invadir el miometrio e inducir la remodelación de las arterias espirales uterinas durante la placentación. Esto provoca disminución de la perfusión de la unidad uteroplacentaria, condicionando hipoxia que activa HIF-1, promueve la expresión del factor de crecimiento de transformación β_3 (TGF β_3) y la síntesis del receptor-1 soluble del VEGF (sVEGFR1)⁶⁰, que bloquea al VEGF y empeora la perfusión de la placenta. En este contexto, son posibilidades terapéuticas la inhibición de HIF-1/TGF β_3 con oligonucleótidos antisentido, o la administración de VEGF.

En el crecimiento intrauterino retardado existe disminución de perfusión placentaria e hipoxia. IGFBP-1 (*insulin growth factor binding protein-1*) constituye un regulador negativo de IGF y éste está inducido por la presencia de sitios HREs en el promotor del gen que le da origen. IGFBP-1 está muy aumentado en sangre de cordón umbilical de neonatos con retraso de crecimiento⁶¹.

Sobredosis de fármacos: La hipoxia estimula, a través de HIF-1, la expresión de sub-unidades del citocromo p450, como CYP3A6, influyendo por lo tanto en la capacidad de neutralización y eliminación de drogas y pro-

ductos tóxicos y de desecho metabólico durante la hipoxia⁶².

Enfermedad inflamatoria intestinal: La sobreexpresión de HIF-1 protege el epitelio colónico ante la inflamación, mientras que la ausencia de HIF-1 produce el efecto contrario⁶³.

Patología retiniana: En modelos animales, se ha observado que la exposición a hiperoxia en el período neonatal, determina regresión vascular e isquemia, fenómenos similares a los descritos en la retinopatía de la prematuridad y que se relacionan con alteraciones de la expresión génica. Del mismo modo, se considera crucial el papel de péptidos como el VEGF en la neovascularización retiniana de la diabetes mellitus y otras retinopatías proliferativas⁶⁴⁻⁶⁶. Este es uno de los campos en los que el progreso terapéutico puede ser más acelerado, ya sea mediante incremento o inhibición de HIF-1 y genes dependientes.

Heridas: El VEGF aumenta localmente durante la curación de heridas, involucrando un mecanismo mediado por ROS⁶⁷. En este contexto, la sobre-activación de la vía de HIF-1 puede ser útil para incrementar la vascularización, permeabilidad vascular y cicatrización en heridas donde el VEGF no haya aumentado suficientemente.

La presente no es una revisión exhaustiva de los efectos de HIF-1, pero intenta dar una visión de conjunto de las circunstancias tan diversas en que este factor transcripcional se halla implicado y de las extraordinarias posibilidades terapéuticas que ofrecen su bloqueo o estimulación. En este sentido, HIF-1 representa el eje de un mecanismo central con múltiples conexiones, por lo que la intervención sobre el mismo puede ser un instrumento esencial en el control de múltiples situaciones patológicas.

Agradecimientos: Al Fondo de Investigación Sanitaria (FIS:PI030888), Red Cardiovascular C03/01 (RECAVA, Instituto de Salud Carlos III), Comunidad Autónoma de Madrid (CAM: 08.3/0008.3/2001.3), Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica (IRSIN), Fundación Conchita Rábago.

Referencias

1. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 4604-13.
2. Liu LX, Lu H, Luo Y, et al. Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 908-14.
3. Semenza GL, Neifelt MK, Chi SM, Antonarakis SE. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5680-4.
4. Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995; 270: 1230-7.
5. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510-4.
6. Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, et al. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1alpha. Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem* 1997; 272: 19253-60.
7. Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, et al. Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 1991; 252: 954-8.
8. Wang GL, Semenza GL. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4304-8.
9. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 2001; 292: 468-72.
10. Lando D, Peet DJ, Whelan DA, et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science* 2002; 295: 858-61.
11. Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7987-92.
12. Katschinski DM, Le L, Heinrich D, et al. Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1alpha is dependent on heat shock protein-90 activity. *J Biol Chem* 2002; 277: 9262-7.
13. Isaacs JS, Jung YJ, Mimnaugh EG, et al. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 29936-44.
14. Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* 1988; 242: 1412-5.
15. Maxwell P, Salnikow K. HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 29-35.
16. Michiels C, Minet E, Mottet D, Raes M. Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1231-42.
17. Zelzer E, Levy Y, Kahana C, et al. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *EMBO J* 1998; 17: 5085-94.
18. Feldser D, Agani F, Iyer NV, et al. Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res* 1999; 59: 3915-8.
19. Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, et al. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood* 1999; 94: 1561-7.
20. Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res* 2000; 60: 1541-5.
21. Goralach A, Diebold I, Schini-Kerth VB, et al. Thrombin activates the hypoxia-inducible factor-1 signaling pathway in vascular smooth muscle cells: Role of the p22(phox)-containing NADPH oxidase. *Circ Res* 2001; 89: 47-54.
22. Spinella F, Rosano L, Di C, et al. Endothelin-1 induces vascular endothelial growth factor by increasing hypoxia-inducible factor-1alpha in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 27850-5.
23. Laughner E, Taghavi P, Chiles K, et al. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor

- 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 3995-4004.
24. González-Pacheco FR, Deudero JJP, De Solis AJ, et al. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) incrementa la síntesis de la sub-unidad alfa del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1alpha) en condiciones de normoxia. XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Nefrología (SEN). Oct 2-5 2004, Santa Cruz de Tenerife, España.
 25. Deudero JJP, González-Pacheco FR, De Solis AJ, et al. VEGF increases HIF-1 levels by a superoxide-mediated mechanism. A joint meeting of the Oxygen Club of California and the University of Turín. Sept 7-10, 2005; Alba, Italy.
 26. Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* 1998; 274: L212-9.
 27. Graven KK, Yu Q, Pan D, et al. Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1447: 208-18.
 28. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1996; 271: 32529-37.
 29. Gleadow JM, Ratcliffe PJ. Induction of hypoxia-inducible factor-1, erythropoietin, vascular endothelial growth factor, and glucose transporter-1 by hypoxia: evidence against a regulatory role for Src kinase. *Blood* 1997; 89: 503-9.
 30. Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* 1998; 274: L212-9.
 31. Caniggia I, Mostachfi H, Winter J, et al. Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3). *J Clin Invest* 2000; 105: 577-87.
 32. Rolfs A, Kvietikova I, Gassmann M, Wenger RH. Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 1997; 272: 20055-62.
 33. Yamashita K, Discher DJ, Hu J, et al. Molecular regulation of the endothelin-1 gene by hypoxia. Contributions of hypoxia-inducible factor-1, activator protein-1, GATA-2, AND p300/CBP. *J Biol Chem* 2001; 276: 12645-53.
 34. Eickelberg O, Seebach F, Riordan M, et al. Functional activation of heat shock factor and hypoxia-inducible factor in the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 2094-101.
 35. Mabeesh NJ, Post DE, Willard MT, et al. Geldanamycin induces degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha protein via the proteasome pathway in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 2478-82.
 36. Cai Z, Manalo DJ, Wei G et al. Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2003; 108: 79-85.
 37. Semenza GL. Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer Cell* 2004; 5: 405-6.
 38. Hoppeler H, Vogt M, Weibel ER, Fluck M. Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Exp Physiol* 2003; 88: 109-19.
 39. Semenza GL. Oxygen-regulated transcription factors and their role in pulmonary disease. *Respir Res* 2000; 1: 159-62.
 40. Schulz R, Hummel C, Heinemann S, et al. Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 67-70.
 41. Mason SD, Howlett RA, Kim MJ, et al. Loss of skeletal muscle HIF-1alpha results in altered exercise endurance. *PLoS Biol* 2004; 2: e288.
 42. Quintero M, Mackenzie N, Brennan PA. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. *Eur J Surg Oncol* 2004; 30: 465-8.
 43. Kanno H, Kondo K, Ito S, et al. Somatic mutations of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene in sporadic central nervous system hemangioblastomas. *Cancer Res* 1994; 54: 4845-7.
 44. Gnarr JR, Tory K, Weng Y, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet* 1994; 7: 85-90.
 45. Wellmann S, Guschmann M, Grieth W, et al. Activation of the HIF pathway in childhood ALL, prognostic implications of VEGF. *Leukemia* 2004; 18: 926-33.
 46. Hierholzer C, Billiar TR. Molecular mechanisms in the early phase of hemorrhagic shock. *Langenbecks Arch Surg* 2001; 386: 302-8.
 47. Hierholzer C, Harbrecht BG, Billiar TR, Tweardy DJ. Hypoxia-inducible factor-1 activation and cyclo-oxygenase-2 induction are early reperfusion-independent inflammatory events in hemorrhagic shock. *Arch Orthop Trauma Surg* 2001; 121: 219-22.
 48. Eckardt KU. Anaemia in end-stage renal disease: pathophysiological considerations. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16 Suppl 7: 2-8.
 49. Wiesener MS, Seyfarth M, Warnecke C, et al. Paraneoplastic erythrocytosis associated with an inactivating point mutation of the von Hippel-Lindau gene in a renal cell carcinoma. *Blood* 2002; 99: 3562-5.
 50. Poellinger L, Johnson RS. HIF-1 and hypoxic response: the plot thickens. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14: 81-5.
 51. Fink MP. Pathophysiology of intensive care unit-acquired anemia. *Crit Care* 2004; 8 (Suppl 2): S9-10.
 52. Kakinuma Y, Miyauchi T, Yuki K, et al. Novel molecular mechanism of increased myocardial endothelin-1 expression in the failing heart involving the transcriptional factor hypoxia-inducible factor-1alpha induced for impaired myocardial energy metabolism. *Circulation* 2001; 103: 2387-94.
 53. Schultz A, Lavie L, Hochberg I, et al. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF: significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation* 1999; 100: 547-52.
 54. Li J, Post M, Volk R, et al. PR39, a peptide regulator of angiogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 49-55.
 55. Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* 1998; 274: L212-19.
 56. Justo S, Gil P, González-Pacheco FR, Caramelo C. Anemia en la insuficiencia cardíaca: mecanismos patogénicos. *Rev Esp Cardiol* (En prensa, 2006).
 57. Bergeron M, Yu AY, Solway KE, et al. Induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and its target genes following focal ischaemia in rat brain. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 4159-70.
 58. Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, et al. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol* 2000; 156: 965-76.
 59. Michaud SE, Menard C, Guy LG, et al. Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by cigarette smoke

- exposure: impairment of the HIF-1alpha/VEGF pathway. *FASEB J* 2003; 17: 1150-2.
60. Vuorela P, Helske S, Hornig C, et al. Amniotic fluid soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 95: 353-7.
 61. Tazuke SI, Mazure NM, Sugawara J, et al. Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 10188-93.
 62. Fradette C, Du SP. Effect of hypoxia on cytochrome P450 activity and expression. *Curr Drug Metab* 2004; 5: 257-71.
 63. Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, et al. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *J Clin Invest* 2004; 114: 1098-106.
 64. Ferrara N. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J Mol Med* 1999; 77: 527-43.
 65. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 905-9.
 66. Ozaki H, Yu AY, Della N, et al. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 182-9.
 67. Sen CK, Khanna S, Babior BM, et al. Oxidant-induced vascular endothelial growth factor expression in human keratinocytes and cutaneous wound healing. *J Biol Chem* 2002; 277: 33284-90.

Succès et fragilité des antibiotiques

Mais, s'il fallait dater l'acte de naissance de l'antibiothérapie, on pourrait se risquer à proposer la date du 16 juillet 1877. Ce jour-là à l'Académie des Sciences, Louis Pasteur signait avec Jules François Joubert une longue communication sur le vibron septique et la bactérie charbonneuse. Ils démontraient ainsi l'antagonisme naturel de ces deux espèces bactériennes: "Le développement de la bactérie ne peut avoir lieu que de manière très pénible quand elle est en présence d'autres organismes microscopiques [...]. Chez les êtres inférieurs plus que dans les grandes espèces animales et végétales, la vie empêche la vie". Pasteur avait démontré que la croissance d'une espèce bactérienne pouvait être inhibée par certaines autres bactéries.

Éxito y fragilidad de los antibióticos

[...] Pero, si hubiera que dar la fecha del nacimiento de la antibióticoterapia, se podría arriesgar a proponer el 16 de julio de 1877. Ese día, en la Academia de Ciencias, Louis Pasteur presentó con Jules François Joubert una larga comunicación sobre el vibrión séptico (*Clostridium perfringens*) y la bacteria carbonosa (*Bacillus anthracis*). Ellos mostraban así el antagonismo natural de estas especies bacterianas: "La bacteria sólo puede desarrollar muy difícilmente cuando está en presencia de otros organismos microscópicos [...]. En los seres inferiores más que en las grandes especies animales y vegetales, la vida impide la vida". Pasteur había demostrado que el crecimiento de una especie bacteriana podía ser inhibida por ciertas otras bacterias.

François Chast

Histoire contemporaine des médicaments. Paris: La Découverte/Poche, 1995, p 238

Induction of Hypoxia-inducible Factor 1 α Gene Expression by Vascular Endothelial Growth Factor*

Received for publication, May 10, 2007, and in revised form, February 19, 2008. Published, JBC Papers in Press, February 27, 2008, DOI 10.1074/jbc.M703875200

Juan José P. Deudero[‡], Carlos Caramelo[‡], María Carmen Castellanos[§], Fernando Neria[‡], Ruth Fernández-Sánchez[‡], Olalla Calabia[‡], Silvia Peñate[‡], and Francisco Román González-Pacheco^{‡1}

From the [‡]Laboratorio de Nefrología-Hipertensión, Fundación Jiménez Díaz-Capio and [§]Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, 28040 Madrid, Spain

Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) is critically dependent on hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). However, not only hypoxia, but selected growth factors can induce HIF-1. High levels of both VEGF and HIF-1 coexist in certain conditions, e.g. tumors. Nonetheless, the possibility that the stimulatory relationship between HIF-1 and VEGF may be bi-directional has not been addressed up to date. The present study in endothelial cells analyzed whether HIF-1 is regulated by a product of its own transcriptionally activated genes, namely, VEGF. As a main finding, VEGF-A₁₆₅ induced the increase of HIF-1 α mRNA and HIF-1 α protein and nuclear translocation. Autologous endothelial cell VEGF mRNA and protein were also increased upon exposure to exogenous VEGF. The signaling implication of reactive oxygen species was examined by comparison with H₂O₂ and hypoxanthine/xanthine oxidase and by the superoxide dismutase mimetic, MnTMPyP, the Rac1-NAD(P)H oxidase complex inhibitor, apocynin, transfection of a dominant negative Rac1 mutant, and transfection of a p67phox antisense oligonucleotide. Superoxide anion, largely dependent on Rac1-NAD(P)H oxidase complex activity, was the critical signaling element. The transductional functionality of the pathway was confirmed by means of a reporter gene flanked by a transcription site-related VEGF sequence and by quantitative PCR. In summary, the present results reveal a previously undescribed action of VEGF on the expression of its own transcription factor, HIF-1, and on VEGF itself. This effect is principally mediated by superoxide anion, therefore identifying a new, potentially relevant role of reactive oxygen species in VEGF signaling.

Angiogenesis is a principal component of physiologic vascular remodeling. However, it is also a major mechanism in dis-

eases as diverse as tumor neovascularization, proliferative retinopathies, or chronic ischemia. VEGF² family members are key mediators of the angiogenic process. In EC, VEGF-A₁₆₅ binds to two main tyrosine kinase receptors, i.e. VEGF receptor 1 (VEGFR1) and VEGF receptor 2 (VEGFR2), activating a host of mechanisms, including proliferation, chemotaxis, and permeability and increasing the expression of numerous proteins (1). In addition to its function as a mitogen, VEGF has EC protective properties which result in enhanced survival and resistance (2, 3). This VEGF-induced protection is effective against different noxious stimuli, including serum deprivation, oxidative challenge, calcineurin binding drugs, and cytoskeletal disruption (4).

Even though VEGF expression is regulated by a number of stimuli, hypoxia is the principal trigger to increase VEGF gene transcription. This increment is mainly mediated by a specialized transcription factor, HIF-1 (5). HIF-1 is a heterodimer composed by two subunits (HIF-1 α and HIF-1 β) with apparent molecular masses of 120–130 and 91–94 kDa, respectively (6). The mRNA of both subunits is expressed constitutively, albeit in variable amounts. However, HIF-1 α protein and HIF-1 activity are only detectable in cells exposed to hypoxia (7).

Recently, several growth factors and cytokines have also been reported to induce HIF-1 α protein synthesis and HIF-1 activity in normoxia (8–14). The major signaling pathways identified as contributing to the HIF-1 α induction by these growth factors include phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (protein kinase B) and Ras/MAPK/phosphatidylinositol 3-kinase (MEK) (10, 11, 14–16). In these circumstances the transactivated HIF-1 leads to increased VEGF synthesis and/or protein stabilization, therefore amplifying the angiogenic signal. The limits and potential importance of this type of HIF-1 activation have not yet been accurately appraised.

Among their numerous effects, ROS participate in activation pathways for redox-sensitive transcription factors mainly through protein tyrosine phosphorylation (17–19). Among these activations, that of HIF-1 is singularly relevant. In addition, the interaction of certain growth factors with their tyrosine kinase receptors leads to ROS production. ROS act as ubiq-

* This study has been supported by Red Cardiovascular of Instituto de Salud Carlos III (RECAVA), Fondo de Investigaciones de la Seguridad Social (FIS: PI030888; PI061247), Comunidad Autónoma de Madrid (CM, GR/SAL/0418/2004), CM-Acute Renal Failure Consortium, Fundación Conchita Rábago, Fundación Jiménez Díaz-Capio, Sociedad Española de Nefrología, Instituto Reina Sofía de Investigación Nefrológica, Janssen Cilag (Madrid, Spain), and Amgen SA (Barcelona, Spain). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

We dedicate this work in memoriam of Dr. Carlos Caramelo.

¹ To whom correspondence should be addressed: Northwestern University, The Feinberg School of Medicine, 303 East Superior, Tarry Bldg. 4-750/752 Chicago, IL 60611. Tel.: 312-503-2923; Fax: 312-503-0622; E-mail: fromanglez@gmail.com.

² The abbreviations used are: VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, VEGF receptor; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ROS, reactive oxygen species; JNK, c-Jun NH₂-terminal kinase; CHX, cycloheximide; HIF-1, hypoxia-inducible factor 1; EC, endothelial cell(s); PlGF, placental growth factor; ESA, erythropoietic-stimulating agents; HX, hypoxanthine; XO, xanthine oxidase; PBS, phosphate-buffered saline; mAb, monoclonal antibody; L-NAME, N^G-nitro-L-arginine methyl ester.

uitous intracellular messengers, *e.g.* O₂⁻ and H₂O₂ in mitogenic and cytoprotective responses (20–23). In terms of mechanism, the main pathway of receptor tyrosine kinase-mediated ROS production involves the Rac1-NAD(P)H oxidase-like membrane complex (24–27). Colavitti *et al.* (28) have demonstrated the effect of VEGF-induced ROS production as a downstream angiogenic signal, which is conveyed through the VEGFR2 (29).

Taking into account the aforementioned role of Rac1-NAD(P)H oxidase complex as a main source of ROS in vascular tissue (30) as well as the capability of VEGF for signaling through ROS and the described effect of ROS in HIF-1 activation, the hypothesis was raised that the products of HIF-1-activated genes, *e.g.* VEGF or erythropoietin, may act on the expression of HIF-1 itself. A series of experiments has been performed to examine this hypothesis and to clarify the signaling mechanisms involved. The potential importance of the pathway we examined herein can be traced to an ample setting of non-hypoxic inflammatory conditions and to neoplastic cells.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture—Bovine aorta EC were obtained, cultured up to confluence, and characterized as previously described (31). These cells, named simply as EC throughout the manuscript, were used between the second and fifth passages. Under these conditions, EC response has been tested by growth rate assays in the presence of recombinant human VEGF-A₁₆₅ (henceforth designed as VEGF) (31, 32).

Experimental Maneuvers—After 24 h of depletion in minimum essential medium/D-Val without calf serum, cells were incubated for different times with VEGF (R&D Systems, Minneapolis, MN), darbepoietin α (Aranesp^{NR}), a gift of Amgen SA (Barcelona, Spain), or erythropoietin α (Eprex^{NR}), a gift of Janssen-Cilag (Madrid, Spain). When indicated, EC were pretreated with specific drugs or their vehicles for 30 min. Drugs used were the NAD(P)H oxidase inhibitor, apocynin (1 mM), the cell-permeable superoxide dismutase mimetic, MnTMPyP (25 μ M), the p38 MAPK inhibitor, SB203580 (20 μ M) (Calbiochem), the JNK inhibitor, dicumarol (20 μ M), the p42/p44 MAPK inhibitor, PD98059 (100 μ M), and the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, wortmannin (400 nM) (Sigma-Aldrich). The nitric-oxide (NO) synthase inhibitor L-NAME (400 nM, Sigma-Aldrich) was used to study NO and peroxynitrite (ONOO⁻) implication. Protein synthesis was inhibited by cycloheximide (CHX, 10 μ g/ml), CoCl₂ was used as an hypoxic equivalent, and HX (2 mM)/XO were used as donors of O₂⁻ (Sigma-Aldrich). The efficacy of H₂O₂ exposure in this system has been previously checked by electrophoretic mobility shift assay of NF κ B.

Protein Extraction—After the different treatments, the EC were washed and scrapped in 1 ml of cold PBS. Cytoplasmic and nuclear proteins for Western blots were extracted using the method described by Schreiber *et al.* (33) and quantified by Coomassie Plus Protein Assay Reagent method (Pierce). Extraction buffers contained 0.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol, and 2.5 μ g/ml aprotinin, pepstatin A, and leupeptin.

Western Blot Analysis—Proteins (30 μ g) were electrophoretically separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad). Loading and

transfers were verified by staining with Ponceau S Solution (Sigma-Aldrich). Blocked membranes were incubated with blocking buffer containing mouse mAb anti-HIF-1 α (1:250, 4 °C, overnight, BD Transduction Laboratories) or mouse mAb anti- α -tubulin (1:2000, 4 °C, overnight, Sigma-Aldrich) then with blocking buffer containing goat mAb anti-mouse HRP-conjugated (1:6000, Bio-Rad) and revealed using the ECL system and exposed to Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences). Quantifying of ECL images was done using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

Plasmids and Transfections—For expression vectors a dominant negative mutant of Rac1 (pcDNA3-Rac1N17) was transfected and overexpressed to inhibit superoxide production dependent from Rac1-NAD(P)H oxidase. This vector was kindly provided by Dr. Alberto Muñoz (Instituto de Investigaciones Biomédicas de Madrid). A pcDNA3-empty vector was used as the control.

Antisense Oligonucleotide for p67phox—Antisense or sense oligonucleotides for the Rac1-NAD(P)H oxidase complex protein, p67phox (antisense oligonucleotide, 5'-CGGCCAGGGA-CATGGTCAGG-3'; sense oligonucleotide, 5'-CCTGACCATGTCCCTGGCCG-3' (Metabion, Martinsried, Germany)) were added to primary bovine aorta EC at a 2 μ M concentration and incubated for 72 h before treatment with 40 ng/ml VEGF for 6 h. Sense oligonucleotide was used as control.

Detection of O₂⁻ Production by Dihydroethidium—After 24 h of serum deprivation, confluent EC cultured in poly-L-lysine-coated coverslips (BD Biosciences) were treated with 40 ng/ml VEGF or vehicle for 1 h and thereafter incubated with 10 mM dihydroethidium (Calbiochem). After that, EC were washed twice with cold PBS and fixed with Merckofix (Merck). To estimate the amount of O₂⁻ production, confluent EC with the same treatment as just described were incubated in the presence of the O₂⁻-generating system, HX/XO. Fluorescence of the oxidized form of dihydroethidium, *i.e.* ethidium, was measured using an Infinite F200 fluorometry system (Tecan Ibérica, Barcelona, Spain). Images were obtained using a fluorescence microscope (Nikon, Madrid, Spain). Quantifying of images was done using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD).

Reporter Plasmids—The reporter construct VEGF-luc was kindly provided by Dr. Gregg Semenza (John Hopkins Hospital). This construct contains the human VEGF sequence from -2274 to 379 relative to the transcription initiation site (5) ligated into the KpnI-MluI sites of pGL2-Basic (Promega Biotech Ibérica, Madrid, Spain), a firefly luciferase reporter vector. Cells were co-transfected with each reporter construct (VEGF-luc and pGL2-Basic) and the renilla luciferase vector pRL-CMV (Promega Biotech Ibérica) stimulated with or without VEGF (40 ng/ml) or XO (2.5 milliunits/ml) for 12 h and then treated with active lysis buffer according to the Dual-Luciferase assay. The results were expressed as relative luciferase activity.

Transient Expression Assays—Transient expression of EC was carried out using CaCl₂ method. Briefly, the EC were grown to near confluence (80–90%). The optimal transfection was achieved at a CaCl₂ to DNA ratio of 6.5 mM to 10 μ g/ml, respectively. For the reporter assays the DNA quantities were 0.1 and 10 μ g/ml for pRL cytomegalovirus and VEGF-luc/pGL2-Basic, respectively. The CaCl₂-DNA complex was performed in HBS

buffer (21 mM HEPES, 0.14 M NaCl, 5.5 mM D(+) glucose, 50 mM KCl, 1.32 M Na₂HPO₄ at pH 7.1). The transfection mix remained during an additional time of 6 h; hence, cells were washed with PBS \times 2, and growth medium was added until confluence (24–48 h). Cell stimulations were performed as described. To evaluate transfection efficiency, all assays were also transfected using pEGFP-N1 vector (BD Biosciences). Transfection efficiency was more than 50% in all cases.

RNA Isolation and Quantitative Reverse Transcription-PCR—RNA was extracted using the Tripure Isolation Reagent (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was extracted at 6, 12, and 24 h after treatments based on previous studies in our laboratory. One μ g of total RNA from each sample was retrotranscribed to cDNA (Improm-II reverse transcriptase; Promega). 1–3 μ l of cDNA samples were used as the template for amplification reactions carried out with the LC Fast Start DNA master SYBR Green I kit (Roche) following the manufacturer's instructions. PCR amplifications were carried out in a Light Cycler System (Roche Diagnostics), and data were analyzed with LightCycler software 3 Version 3.5.28 (Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT). For analysis purposes, the amplicon for each of the analyzed genes was cloned, and known amounts of the cloned product were used to generate a standard curve. The number of copies of the gene of interest in each sample was extrapolated from the corresponding standard curve by the indicated software. For each sample, duplicate determinations were made, and the gene copy number was normalized by the amount of β -actin. The primer pairs used in this study are reported elsewhere (35).

Immunofluorescence Assay—EC were grown and treated on Falcon Culture Slides (BD Biosciences) and were washed \times 5 with PBS and fixed with Merckofix (Merck). Fixed cells were permeabilized with 0.2% (v/v) Triton X-100 in PBS (15 min), washed, and incubated in blocking buffer for 1 h (PBS with 1% bovine serum albumin). Slides were incubated overnight with mouse mAb anti-VEGF primary antibody (1:500). Slides were then washed and incubated with goat mAb anti-mouse coupled to FITC (1:2000) for 2 h (both, Sigma-Aldrich). Propidium iodide (Sigma-Aldrich) was added (45 min, 50 ng/ml) for visualization of the cell nucleus. Images were obtained using a Confocal System TCS SP20 (Leica, Madrid, Spain). Quantifying of images was done using ImageJ software (National Institutes of Health).

Statistics—Results are expressed as the mean \pm S.D. Unless stated otherwise, values correspond to a minimum of five experiments done by triplicate. When applicable, Student's *t* test or analysis of variance were used to compare variables. Fisher and Scheffe tests for multiple comparisons were used to determine the *p* value, which was considered significant at < 0.05 . The statistic analyses were performed with the Windows SPSS 10.0 package (SPSS Inc. Chicago, IL).

RESULTS

VEGF Increases Nuclear HIF-1 α Protein in a Time- and Concentration-dependent Manner—EC were incubated under different experimental conditions, and cytoplasmic and nuclear extracts were loaded according to protein quantization. As can be seen in Fig. 1A, only trace levels of HIF-1 α could be detected

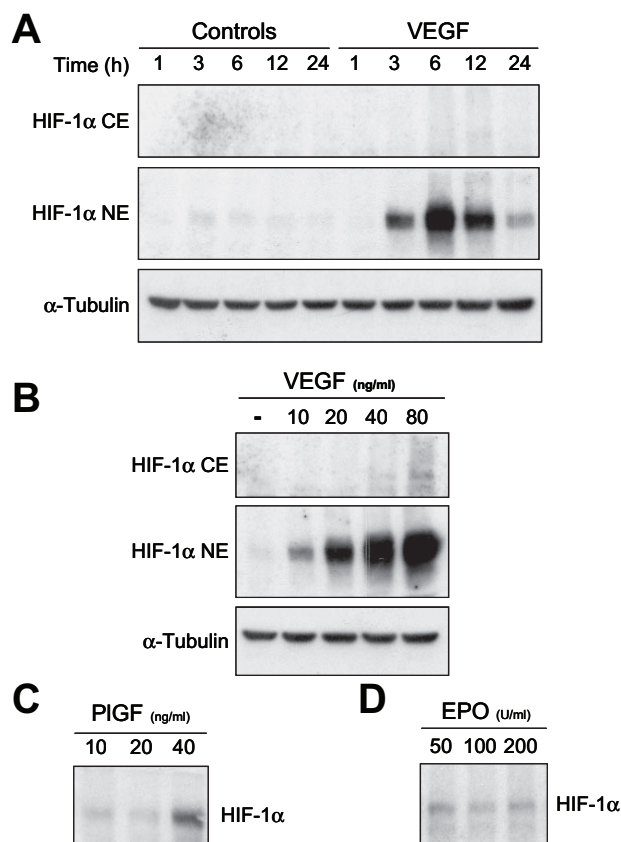


FIGURE 1. Cytoplasmic and nuclear HIF-1 α protein levels in EC after exposure during different concentrations of VEGF during different times. A and B are Western blots from cytoplasmic (HIF-1 α CE) and nuclear (HIF-1 α NE) extracts, whereas C and D are from nuclear extract. Each image is representative of at least five experiments with similar results. A, nuclear HIF-1 α protein level is increased in a time-dependent manner. EC were stimulated with VEGF (40 ng/ml) for the indicated times ($p < 0.01$ from 6 to 24 h). B, nuclear HIF-1 α protein is increased in a concentration-dependent manner. EC were stimulated with VEGF (40 ng/ml) for the indicated times ($p < 0.01$ from 6 to 24 h). C, PlGF increases nuclear HIF-1 α protein. EC were stimulated with different concentrations of PlGF for 6 h. Control (-) correspond to untreated cells ($p < 0.05$ for 10 ng/ml and $p < 0.01$ for 20, 40, and 80 ng/ml). α -Tubulin protein level was used as quantification and Western blot loading control. D, erythropoietin (EPO) does not increase nuclear HIF-1 α protein level. EC were stimulated with different concentrations of erythropoietin for 6 h. A similar absence of effect was found with darbepoietin (data not shown).

in the nuclear extract of untreated EC. VEGF (40 ng/ml) treatment increased nuclear HIF-1 α protein in a time-dependent manner (Fig. 1A), reaching the maximum level after 6 h. At all the time points assessed, HIF-1 α protein was undetectable in the cytoplasmic extract. Nuclear HIF-1 α increased in the presence of VEGF in a concentration-dependent manner (Fig. 1B). An additional experiment was performed to ascertain whether a selective ligand of VEGFR1, *i.e.* placental growth factor (PlGF), was able of inducing an increase of HIF-1 α . As can be observed in Fig. 1C, PlGF increased nuclear HIF-1 α protein. Of importance, the concentration-response curve of PlGF was rightward shifted with respect to that of VEGF ($p < 0.01$). Because VEGF binds to both types of receptors, whereas PlGF binds only to VEGFR1, the difference between the concentration-response curves of both agents suggests that the two types of VEGF receptor are involved in the response.

To test whether the effects observed with VEGF were shared by the product of another HIF-1 transcriptionally activated

VEGF Induction of HIF-1 α through Superoxide

gene, similar experiments were performed using erythropoietic-stimulating agents (ESAs), namely, darbepoetin and erythropoietin (both at final concentrations equivalent to 50, 100, and 200 units/ml of erythropoietin). These experiments revealed no effects of the ESAs on HIF-1 α protein levels (Fig. 1D).

Superoxide and Rac1 Are Necessary for VEGF-induced HIF-1 α Protein Increase—At a first glance and based on the known regulation of HIF-1 α protein, none of the more common VEGF-induced signaling pathways appeared as a probable regulator of HIF-1 α increase. However, two facts were already known. First, according to the literature (36) and our own data,³ VEGF is capable of inducing ROS production and ROS-dependent NF κ B activation; second, HIF-1 α synthesis can putatively augment by using a ROS-related signaling pathway (12, 37, 38). Accordingly, our analysis was focused on the investigation of whether ROS were involved in the increased VEGF-induced HIF-1 α expression. With this purpose we first examined the effect of both exogenously added H₂O₂ and O₂^{•−} for 6 h. As shown in Fig. 2A, no effect on HIF-1 α protein level was observed within the range of 2–250 μ M H₂O₂. On the contrary, a clear-cut effect of O₂^{•−} was found with the HX/XO system. In these conditions, HIF-1 α protein levels were directly proportional to O₂^{•−} production. Of note, because a saturating HX concentration (2 mM) was used, O₂^{•−} generation by the HX/XO system was dependent on XO concentration. Based on this background, we further investigated the participation of O₂^{•−} in VEGF-induced HIF-1 α increase. The main source of O₂^{•−} in EC in conditions of normal aerobic metabolism are the oxidases of the Rac1-NAD(P)H complex (36). Therefore, EC were incubated with VEGF or HX/XO in the presence or in the absence of the non-scavenging, specific Rac1-NAD(P)H oxidase complex inhibitor, apocynin (1 mM), and the cell-permeable superoxide dismutase mimetic, MnTMPyP (25 μ M). As shown in Fig. 2B, apocynin completely blocked VEGF- but not HX/XO-induced HIF-1 α increase, whereas MnTMPyP completely blocked both stimuli. Additionally, we determined whether NO or ONOO[−] formed from NO + O₂^{•−} were implicated in the VEGF- and HX/XO-induced HIF-1 α protein increase. With this purpose, EC were also incubated with the nitric-oxide synthase inhibitor, L-NAME (400 nM). No effect of L-NAME was detected in VEGF-treated EC, but a small one could be observed when treated with HX/XO (Fig. 2B).

The effects of apocynin gave us an important clue about the participation of Rac1-NAD(P)H. Therefore, to provide a specific confirmation of its role in VEGF-increased HIF-1 α protein level, EC were transfected with a dominant negative mutant of Rac1. As shown in Fig. 2C, expression of a negative form of Rac1 is enough to abolish the VEGF effect on HIF-1 α increase. With the purpose of ruling out the remote, albeit real, possibility that the effect of Rac1 inhibition might have been independent of NAD(P)H, EC were transfected with a p67phox antisense oligonucleotide. This antisense oligonucleotide also blocked the VEGF effect (Fig. 2, D and E). Collectively, this set of results supports that the Rac1-NAD(P)H oxidase complex is involved and

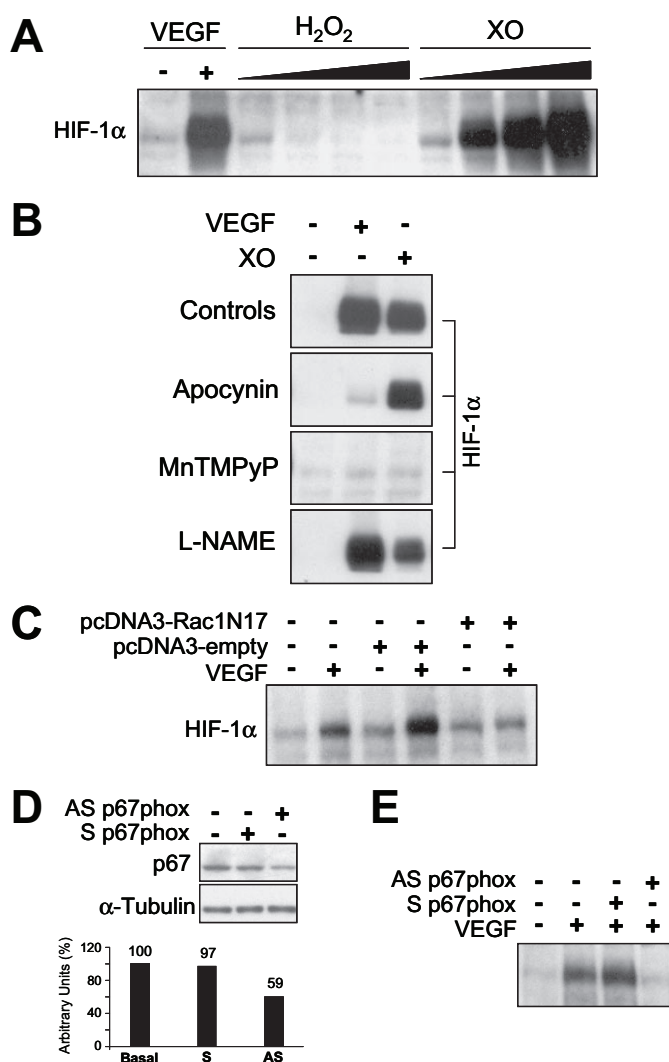


FIGURE 2. Role of ROS and Rac1 in VEGF-related HIF-1 α protein synthesis. All figures are Western blots from nuclear extracts. A, O₂^{•−} but not H₂O₂ has effect on nuclear HIF-1 α protein levels. EC were treated with increasing H₂O₂ (2, 10, 50, and 250 μ M) or XO (0.5, 2.5, 5, 12.5 milliunits/ml) concentrations for 6 h. HX was used at 2 mM. B, inhibitory effects on nuclear HIF-1 α protein levels of apocynin and MnTMPyP. Apocynin (1 mM), MnTMPyP (25 μ M), and L-NAME (400 nM) were added 30 min before VEGF (40 ng/ml) or XO (2.5 milliunits/ml) exposure and maintained for the 6 h of the experiment. The ECL images correspond to the same experiment and same gel. Therefore, time of exposure is the same. C, Rac1 is necessary for VEGF-related HIF-1 α protein increase. Cells were transfected and overexpressed with a dominant negative mutant of Rac1 (pcDNA3-Rac1N17). pcDNA3 empty vector was used as control. D, exposure to 2 μ M p67phox antisense (AS) oligonucleotide (72 h) reduces p67 expression. S, sense. E, p67 is necessary for VEGF-related increase of HIF-1 α protein. 2 μ M p67phox during 72 h antisense oligonucleotide blocks HIF-1 α increase. + and − indicate the presence or absence of corresponding vector, oligonucleotide, or stimuli. The results shown correspond to one representative set of experiments of four or five yielding similar results.

necessary in VEGF signaling on HIF-1 α and that O₂^{•−} acts as a second messenger of VEGF in the induction of HIF-1 α protein increase. This effect appears to be more probably related to a direct action of O₂^{•−} itself rather than by means of ONOO[−] formation.

VEGFs Increase O₂^{•−} Production in EC—To confirm O₂^{•−} production by VEGF, we labeled EC with the cell-permeable molecule, dihydroethidium. Two different experiments were carried out with this method, both based on the capability of dihydroethidium to react specifically with O₂^{•−}, producing ethidium, which has different fluorescent properties than dihy-

³ J. J. P. Deudero, C. Caramelo, M. C. Castellanos, F. Neria, R. Fernández-Sánchez, O. Calabia, S. Peñate, and F. R. González-Pacheco, unpublished observations.

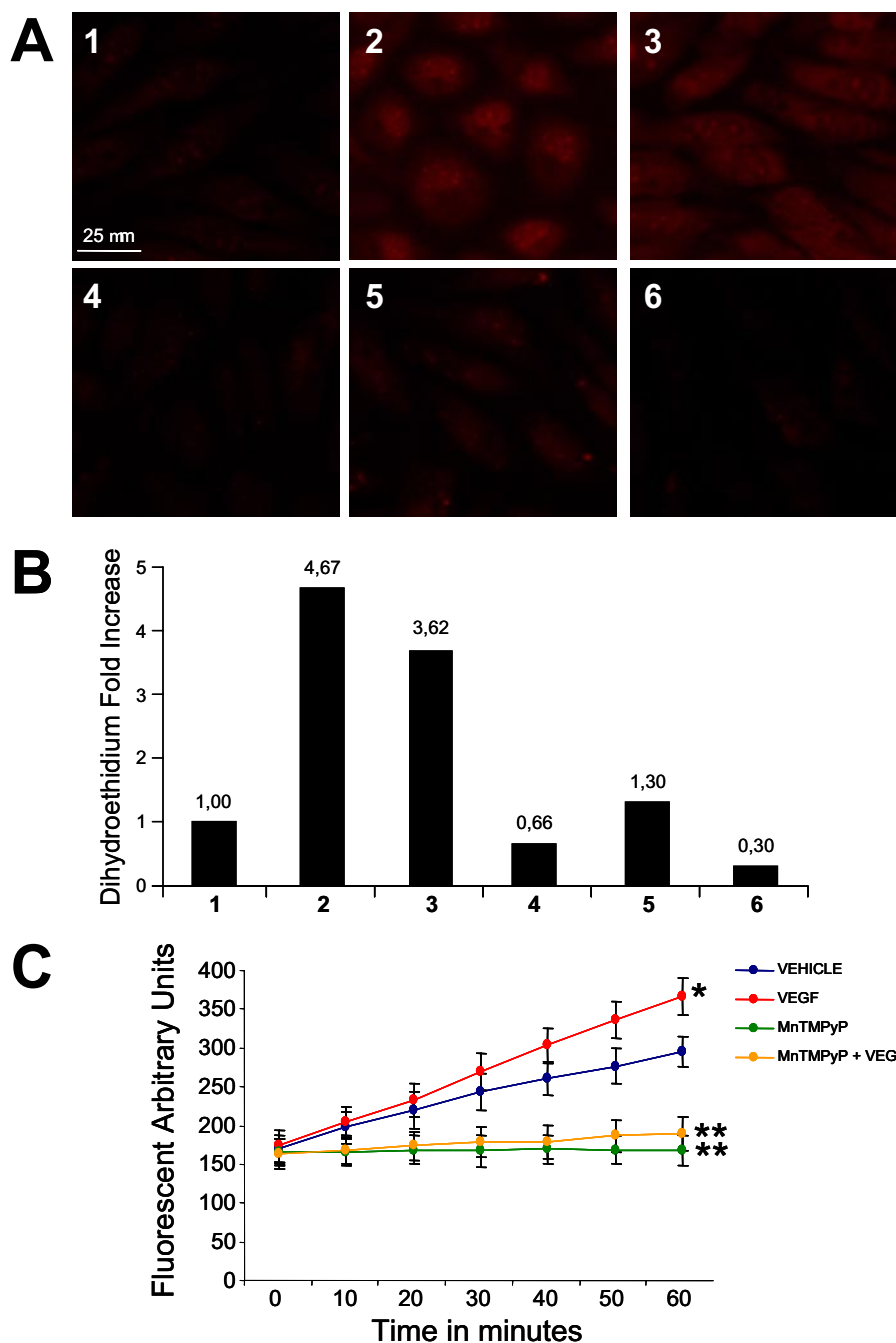


FIGURE 3. A, fluorescence microscopy images of dihydroethidium-labeled EC. The red color corresponds to ethidium fluorescence as results from dihydroethidium oxidation by superoxide anion. EC were stimulated with VEGF or XO in the presence or absence of specific inhibitors during 1 h. 1, non-stimulated cells; 2, 2.5 milliunits/ml XO treatment; 3, 40 ng/ml VEGF treatment; 4, 25 μ M MnTMPyP treatment; 5, XO treatment in presence of MnTMPyP; 6, VEGF treatment in presence of MnTMPyP. B, relative quantification of fluorescence microscopy images shown in A. 1, non-stimulated cells; 2, 2.5 milliunits/ml XO treatment; 3, 40 ng/ml VEGF treatment; 4, 25 μ M MnTMPyP treatment; 5, XO treatment in presence of MnTMPyP; 6, VEGF treatment in the presence of MnTMPyP. C, relative fluorescent quantification of dihydroethidium oxidation to ethidium. EC labeled with dihydroethidium were stimulated for 1 h with vehicle (basal) or 40 ng/ml VEGF in the presence or in the absence of the superoxide dismutase mimetic, MnTMPyP (25 μ M). Measurements were obtained at different times. **, $p < 0.001$ of the curve with respect to the vehicle; *, $p < 0.05$ with respect to the vehicle.

droethidium. Therefore, ethidium formation depends of O_2^- levels. On the first experiment, we detected ethidium formation, i.e. O_2^- production, by means of fluorescent microscopy (Fig. 3, A and B). On the second experiment, we analyzed ethidium/ O_2^- production by using a fluorescence detector (Fig.

3C). On the first experiment, cells were fixed after VEGF exposure; on the second experiment, fluorescent detection was carried out in real time, whereas EC were stimulated alive on culture wells. In both cases, VEGF exposure (40 ng/ml) increased ethidium fluorescence, and the cell-permeable superoxide dismutase mimetic MnTMPyP (25 μ M) abolished this effect. In setting-up studies, we ruled out the existence of a fluorescence quenching by MnTMPyP.

VEGF and ROS-induced HIF-1 α Protein Increase Requires JNK, p38, and Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt Activity—A number of proteins could be theoretically involved in VEGF signaling on HIF-1 α . To test the participation of the main pathways possibly implicated in the process, we tested the role of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, JNK, and MAPKs. For this purpose, EC were pretreated with specific inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (wortmannin), JNK (dicumarol), and MAPKs, namely, p38 (SB203580) and p42/44 (PD98059), and then stimulated with VEGF or HX/XO. As shown in Fig. 4A, blockade of all the kinases, except p42/p44, markedly inhibited the effects of both VEGF and HX/XO signaling on HIF-1 α increase. Based on these screening findings, we analyzed VEGF capability to activate JNK, p38, and Akt by assessing the status of their phosphorylated forms after VEGF exposure. As shown in Fig. 4B, VEGF increased JNK and p38 phosphorylation after 30 min of stimulation, with an apparent peak at about 60 min. Akt phosphorylation was already detected in the earliest sample (1 min), but no increase was evident under the effect of VEGF (Fig. 4B).

VEGF Does Not Affect HIF-1 α Protein Degradation but Increases HIF-1 α mRNA Levels Using O_2^- as

an Intracellular Mediator—The findings mentioned above prompted us to study the mechanism of VEGF-related HIF-1 α protein increase. HIF-1 α half-life was assessed by comparing HIF-1 α signal as induced by either $CoCl_2$ or VEGF in the presence of the protein synthesis inhibitor,

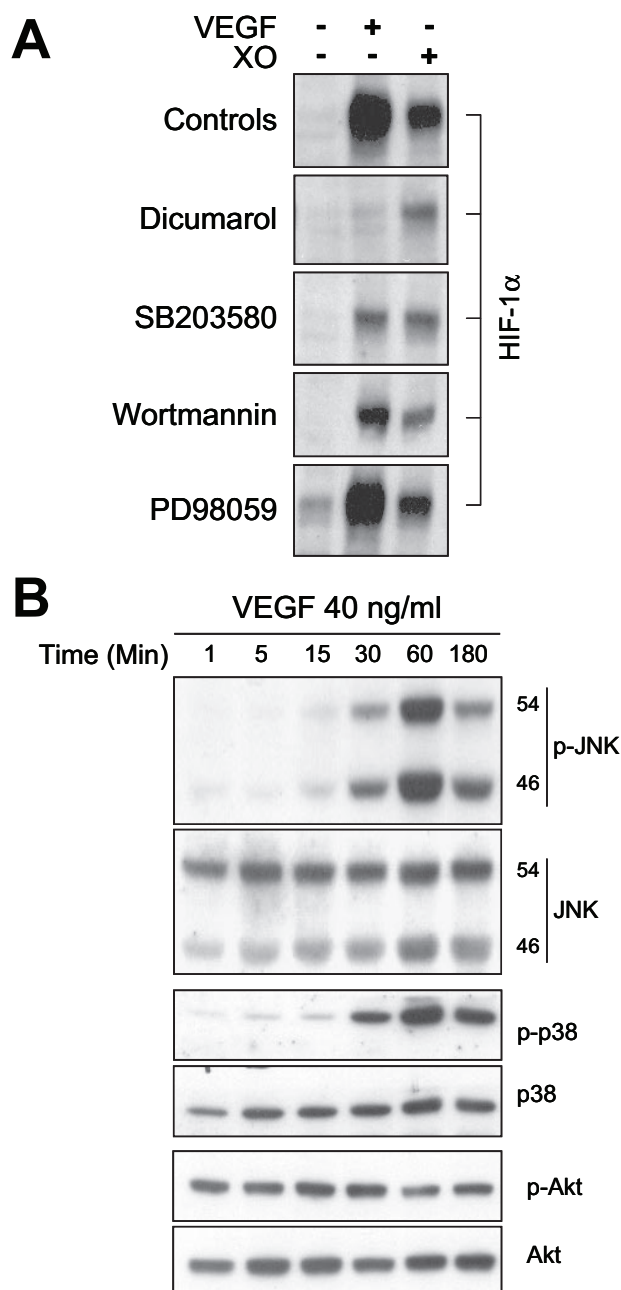


FIGURE 4. A, inhibitory effect on nuclear HIF-1 α protein levels by dicumarol (20 μ M), SB203580 (20 μ M), wortmannin (400 nM), and PD98059 (100 μ M). A HIF-1 α Western blot from EC nuclear extract is shown. EC were incubated with the inhibitors 30 min before the addition of VEGF (40 ng/ml) or XO (2.5 milliunits/ml) and maintained for the 6 h of the experiment. B, phosphorylated (p)-JNK, p-p38, and p-Akt Western blot from EC total extract. EC were stimulated with 40 ng/ml VEGF for 1, 5, 15, 30, 60, and 180 min. Non-phosphorylated forms of JNK, p38, and Akt were used as Western blot loading control. Images of ECL correspond to the same experiment; therefore, time of exposure is the same. The results shown correspond to one representative set of experiments of three yielding similar results.

CHX. CoCl₂ was used as a hypoxia-mimetic, acting as a positive control of inhibited HIF-1 α degradation (39). In EC treated with CoCl₂ (50 μ M) for 6 h, HIF-1 α levels remained more stable 60 min after protein synthesis blockade with CHX. In contrast, after VEGF treatment (40 ng/ml, 6 h), HIF-1 α protein levels were rapidly decreased to base line in less than 30 min (Fig. 5A).

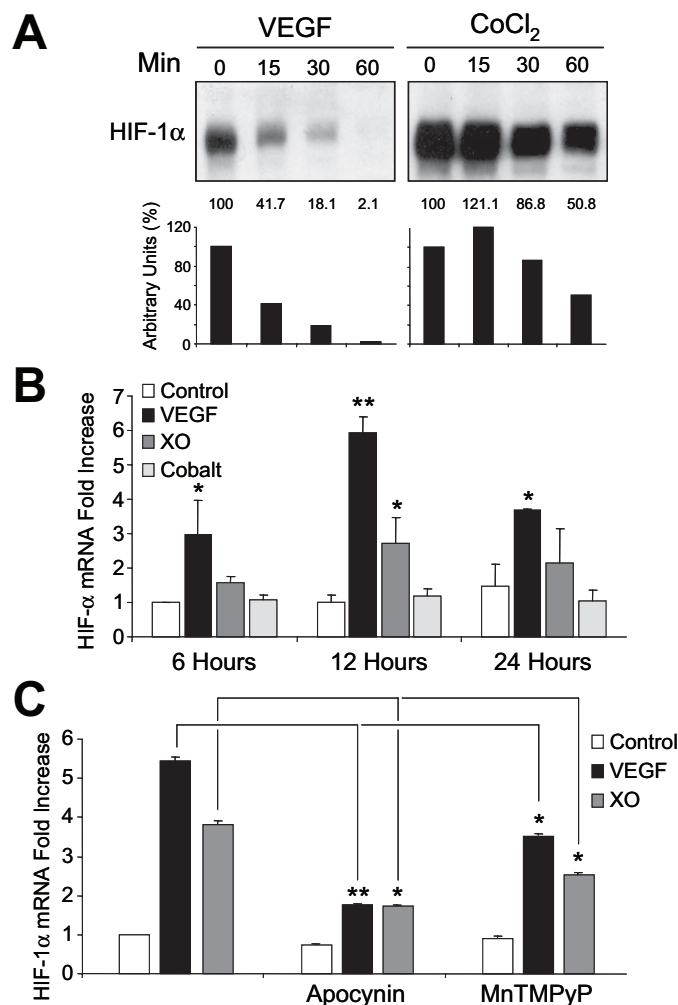


FIGURE 5. HIF-1 α protein half-life and mRNA transcription analysis. A, HIF-1 α protein is rapidly degraded after CHX treatment in VEGF-stimulated but not in CoCl₂-stimulated EC. A Western blot of HIF-1 α from EC nuclear extract is shown. EC were stimulated with VEGF (40 ng/ml) or CoCl₂ (50 μ M) for 6 h. At 6 h CHX (10 μ g/ml) was added for the indicated times without removing the previous stimulus. The experiment shown is one of three yielding similar results. The density values of the protein bands were normalized to the time 0 signal and expressed as percentage. B, HIF-1 α mRNA is increased after VEGF or XO treatment but not with CoCl₂. EC were stimulated with VEGF (40 ng/ml), XO (2.5 milliunits/ml), or CoCl₂ (100 μ M) for 6, 12, and 24 h. The HIF-1 α mRNA transcription level was analyzed by quantitative reverse transcription-PCR. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. C, VEGF and XO-related HIF-1 α mRNA increase was markedly reduced in presence of 1 mM apocynin or 25 μ M MnTMPyP (12 h). *, $p < 0.05$, between VEGF and XO treatment alone or in the presence of apocynin or MnTMPyP.

Further experiments were conducted to analyze the mechanism of HIF-1 α increase by VEGF. Accordingly, the HIF-1 α mRNA production strongly increased after VEGF or HX/XO stimulus (for 6, 12, and 24 h); on the contrary, no changes were observed with CoCl₂ (Fig. 5B). The next studies, done by challenging EC with VEGF or HX/XO for 12 h, showed that a VEGF and HX/XO-related HIF-1 α mRNA increase was markedly reduced in the presence of apocynin (1 mM) or MnTMPyP (25 μ M) (Fig. 5C).

VEGF Promoter Activity, mRNA, and Protein Levels Are Increased after VEGF Treatment—With the aim of analyzing the transductional functionality of the VEGF-HIF-1 α pathway, we investigated whether exogenous VEGF and its putative

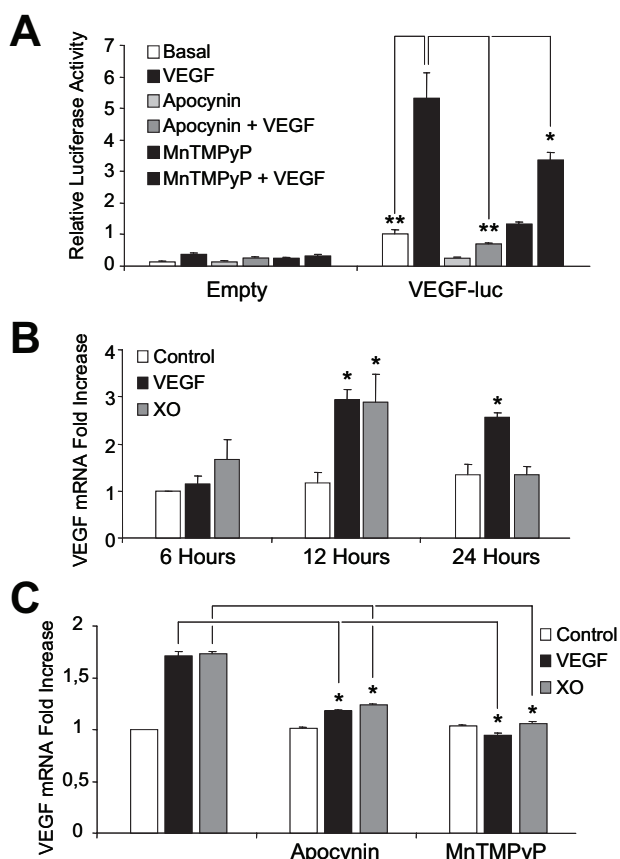


FIGURE 6. VEGF promoter activity; VEGF mRNA studies. A, VEGF promoter activity is increased after VEGF exposure, as assessed by luciferase assay using the reporter construct VEGF-luc. After co-transfection with VEGF-luc and the renilla luciferase vector, EC were stimulated with VEGF (40 ng/ml). Promoter activity was markedly reduced in the presence of apocynin (1 mM) or MnTMPyP (25 μ M). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ between VEGF treatment alone or in the presence of apocynin or MnTMPyP. B, VEGF mRNA is increased after VEGF or XO exposure. EC were stimulated with VEGF (40 ng/ml) or XO (2.5 milliu/ml) for 6, 12, or 24 h. VEGF mRNA was analyzed by quantitative reverse transcription-PCR; *, $p < 0.05$. C, VEGF-related and XO-related VEGF mRNA increase was markedly reduced in the presence of 1 mM apocynin or 25 μ M MnTMPyP (12 h). *, $p < 0.05$ between VEGF and XO alone or in the presence of apocynin or MnTMPyP.

intracellular mediator, O_2^- , are able of increasing VEGF levels in EC. As shown in Fig. 6A, exogenous VEGF (40 ng/ml) induced VEGF promoter activity. This induction was eliminated or considerably decreased by using the non-scavenging, specific Rac1-NAD(P)H oxidase complex inhibitor apocynin (1 mM) and the cell-permeable superoxide dismutase mimetic, MnTMPyP (25 μ M). In the same way, both VEGF and XO stimulus increased VEGF mRNA expression in quantitative reverse transcription-PCR assays (Fig. 6B). This expression reached its maximum after 12 h of VEGF treatment and was blocked in the presence of apocynin (1 mM) or MnTMPyP (25 μ M) (Fig. 6C). In agreement with this finding, VEGF protein was assessed by confocal microscopy. A clear-cut increase was detected after 24 h of VEGF treatment (40 ng/ml); this increase was significantly reduced in the presence of apocynin (1 mM) and MnTMPyP (25 μ M) (Fig. 7). It should be noted that the marked reduction of VEGF green signal in cells having exogenous VEGF added in the presence of apocynin and MnTMPyP (subsets 7 and 8 of Fig. 7A) practically rules out the possibility that the fluorescent

VEGF signal observed in other subsets, e.g. 4, was due to exogenous VEGF.

DISCUSSION

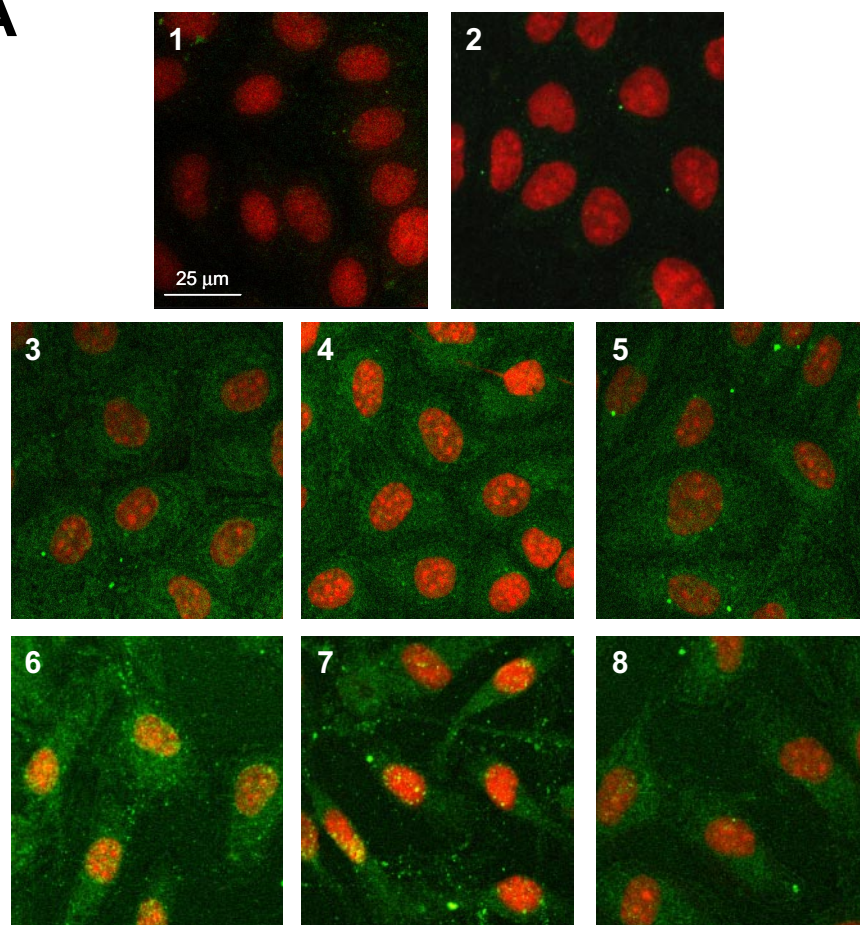
The main outcome of the present study is the detection of a strong stimulation by VEGF on its leading transcriptional factor, HIF-1, and also on its own expression. Even though effects of other growth factors on HIF-1 activation have been previously recognized, to the best of our knowledge the present is the first evidence showing this type of effect with VEGF. A cardinal feature of the present investigation is that VEGF exerts its stimulating action on HIF-1 in the absence of hypoxia; furthermore, our results link the VEGF effect on HIF-1 α to O_2^- . Both pieces of information reveal the existence of a positive feedback of VEGF on HIF-1, which can putatively operate in inflammatory and high VEGF production conditions, namely, malignant tumors. The effects of VEGF appear to be conveyed through both VEGFR1 and VEGFR2 receptors, as judged by comparing the effects of PlGF and VEGF.

The study contains additional new elements. First, the fact that autologous VEGF mRNA and VEGF protein are induced after EC exposure to exogenous VEGF supports the observation that the increase in HIF-1 α is functionally meaningful in terms of transactivation of the VEGF gene. However, the possibility exists, albeit with low probability, of HIF-1 α -independent effects. This hypothetical point is beyond the scope of the present investigation, and additional studies will be needed.

Specifically aimed experiments provided complementary information on the mechanisms by which VEGF induces HIF-1 activation. The effect of VEGF on HIF-1 did not imply a significant inhibition of HIF-1 α degradation but an increase in its synthesis. This increment is timely related to an increased HIF-1 α mRNA, therefore tracing this effect to up-regulation of HIF-1 α gene expression. As aforementioned, the mechanisms found herein have similarities to those described for the increase of HIF-1 α induced by other growth factors; however, our results add new information, disclosing increased HIF-1 α gene expression upon VEGF challenge. Collectively, this group of findings provides further support to the existence of substantial differences in HIF-1 activation pathways by either growth factors or hypoxia (11, 12, 14, 16, 40).

The circumstance that O_2^- has a critical role as a second messenger, leading to HIF-1 α increase by VEGF, opens a new source of interpretation about VEGF signaling process. Stimulation of superoxide production by VEGF has been previously shown by other groups (26, 41–43). However, the consequences of this stimulation in the present experimental setting appear to be rather specific. In fact, the effects of superoxide on HIF-1 are not shared by H_2O_2 . Furthermore, inhibition by the non-scavenging Rac1-NAD(P)H oxidase complex inhibitor, apocynin, supports that Rac1-NAD(P)H oxidase complex is the main source of O_2^- in this signaling pathway. Of practical interest, apocynin is increasingly used in experimental therapeutics (44, 45), therefore leaving open the possibility of a relatively simple practical application of the present findings. Further assessment of the meaning of the apocynin results was obtained by means of experiments with transfection of the Rac1 negative form. In this regard, because Rac1 may be putatively involved in

A



B

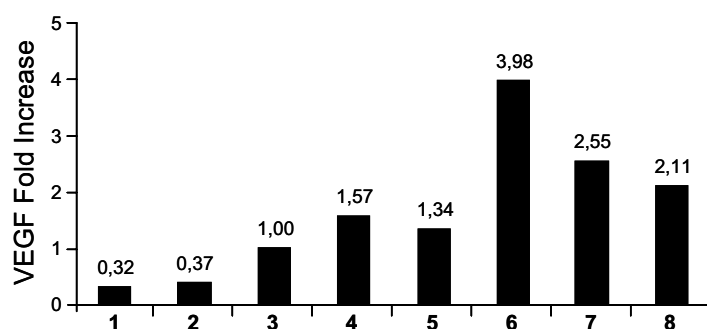


FIGURE 7. Detection of autologous VEGF by immunofluorescence. A, EC were stimulated with VEGF with or without specific inhibitors during 24 h. Then, after extensive washing ($\times 5$) slides were subjected to immunofluorescence assay with specific antibodies. The images were obtained by confocal microscopy ($400\times$). Cell nuclei are marked in red with propidium iodide, and VEGF is marked in green by a secondary antibody coupled to FITC. 1, immunofluorescence control, with nonspecific primary antibody. 2, immunofluorescence control, without primary antibody. 3, non-stimulated cells. 4, apocynin treatment (1 mM). 5, MnTMPyP treatment ($25\ \mu\text{M}$). 6, VEGF treatment (40 ng/ml). 7, apocynin (1 mM) + VEGF (40 ng/ml). 8, MnTMPyP ($25\ \mu\text{M}$) + VEGF (40 ng/ml). Results correspond to one representative set of experiments of five yielding similar results. B, relative quantification of green fluorescence signal corresponding to autologous VEGF of microscopy images showed in A. To achieve these values we used ImageJ software (National Institutes of Health). Each image was split in its three colors, and the green channel was quantified after selection of cells perimeter. The green signal, corresponding to VEGF protein immunodetection of each image, has been normalized with respect to non-stimulated cells signal. 1, immunofluorescence control, with nonspecific primary antibody. 2, immunofluorescence control, without primary antibody. 3, non-stimulated cells. 4, apocynin treatment (1 mM). 5, MnTMPyP treatment ($25\ \mu\text{M}$). 6, VEGF treatment (40 ng/ml). 7, apocynin (1 mM) + VEGF (40 ng/ml). 8, MnTMPyP ($25\ \mu\text{M}$) + VEGF (40 ng/ml). Each relative value has been normalized with respect to non-stimulated cells value.

other cellular pathways (46), a specifically aimed experiment was performed which demonstrated by similarity of effects by a transfected p67phox antisense oligonucleotide that the effects

obtained by Rac1 blockade can be attributed to inhibition of the NAD(P)H oxidase complex. The increase of HIF-1 α by superoxide is not a new finding as far hypoxia is concerned; however, the role of superoxide in VEGF-related induction of HIF-1 α is hereby communicated for the first time.

The absence of effect of a different HIF-1-dependent growth factor, namely, erythropoietin/ESAs, on HIF-1 α suggests that at least in the present conditions, the feedback on HIF-1 α described for VEGF is not a generalized mechanism concerning other factors containing hypoxia-responsive elements in their promoter, *e.g.* erythropoietin. The lack of effect of ESAs on HIF-1 α increase is of considerable practical importance due to their widespread therapeutic use. This may be particularly remarkable in terms of the potential actions of ESAs in angiogenic and cytoprotective processes (48). In fact, our results do not support a view of ESAs as amplifying agents acting on the HIF-1 response. The differences between the effects of VEGF and ESAs on HIF-1 can largely be traced to their different intracellular signaling mechanisms (2, 49), but more in depth experiments focused on signaling may be useful to attain additional insight.

In a broader sense, the existence of a communication between Rac1-NAD(P)H oxidase complex and VEGF receptors is implicit in the results. An effort to define the precise characteristics of this interaction as well as the precise microdomain characteristics of the superoxide signal is being done by leading groups in the field (for a state-of-the-art review, see Refs. 26 and 29). Even though our data indicate that the main signaling molecule of the mechanism studied hereby is O_2^- , a role of NO or ONOO^- , formed by the simultaneous increase of NO (47) and O_2^- in VEGF-targeted cells, could not be

ruled out *a priori*. The experiments using L-NAME were performed with this possibility in mind, and their negative outcome suggests that the interaction between NO and O_2^- on the

HIF-1 α increase by VEGF is not a relevant one. The studies using dihydroethidium have demonstrated in real time that VEGF induces O₂⁻ production.

A number of signal transduction pathways acting between VEGF receptor stimulation and the increase in HIF-1 α protein were examined. The results obtained herein with a set of inhibitors have a screening value and suggest that phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, JNK, and p38 MAPK are involved in the VEGF and HX/XO signal, whereas p42/44 is not. This pattern of activation is coincident with others already described in the literature (40). Collectively, the aforementioned results suggest that phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, JNK, and p38 MAPK are targeted for activation in the context of VEGF-induced O₂⁻ production and are, therefore, most probably implicated in the increased HIF-1 α protein synthesis. The fact that Akt phosphorylation, a previously described effect of VEGF (1), was not detected was rather discordant with the inhibition of VEGF-induced increase of HIF-1 by wortmannin. This result can probably be traced to the existence in the experimental conditions used of Akt phosphorylation at the base line, as can be seen in Fig. 4B (bottom rows). This may diminish the sensitivity of the method to detect an additional increase in phosphorylation by the action of VEGF. Another alternative may be that Akt phosphorylation actually occurred before the first, 1-min sampling. Nonetheless, the actual step order of this signaling sequence cannot be determined from the present results, and further investigation is required to complete this mechanistic framework. In summary, our study reveals the existence of a loop of the main angiogenic growth factor, VEGF, on its principal transcriptional activator, HIF-1. Our results also disclose that VEGF is capable of activating its own expression, an effect presumably involving HIF-1 α . Experiments are in course to precisely clarify this latter issue as well as identify which are the transcriptionally operative signals. In particular, no dampening signal has been identified. However, in this regard the results can be directly explained by the possibility that a critical amount of HIF-1 is mandatory for eliciting VEGF induction. Therefore, HIF-1 dampening can simply be enough to act as the off-regulator of the pathway. In other words, no new off signal beyond decrease of high levels of HIF-1 would be necessary for sustaining the logic of the mechanism.

Several putative biological purposes of the present pathway can be proposed, but the amplification of the effects of VEGF in the absence of hypoxia by means of the recruitment of HIF-1-dependent genes is the one that can be more readily envisioned. In this regard the gene repertoire activated by HIF-1 is by far more extensive than that activated by VEGF alone. In fact, bidirectional VEGF-HIF-1 interactions could be particularly meaningful in the case of malignant tumors, in which a simultaneous increase of both VEGF and HIF-1 does occur (34, 50). Experiments aimed at examining the VEGF-on-HIF-1 effect in other conditions, e.g. hypoxia or inflammation, need to be done to further understand the full implications of this type of activation pathway.

Acknowledgments—We thank Drs. Gregg Semenza and Alberto Muñoz for their generous gift of experimental tools.

REFERENCES

- Ferrara, N. (2004) *Endocr. Rev.* **25**, 581–611
- Zachary, I. (2001) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, 1375–1386
- Gonzalez-Pacheco, F. R., Deudero, J. J., Castellanos, M. C., Castilla, M. A., Alvarez-Arroyo, M. V., Yague, S., and Caramelo, C. (2006) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, 1395–1401
- Alvarez Arroyo, M. V., Suzuki, Y., Yague, S., Lorz, C., Jimenez, S., Soto, C., Barat, A., Belda, E., Gonzalez-Pacheco, F. R., Deudero, J. J., Castilla, M. A., Egido, J., Ortiz, A., and Caramelo, C. (2002) *Transplantation* **74**, 1618–1624
- Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., and Semenza, G. L. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4604–4613
- Wang, G. L., and Semenza, G. L. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 1230–1237
- Wang, G. L., and Semenza, G. L. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 4304–4308
- Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B. Z., Rubinstein, M., and Cohen, B. (1998) *EMBO J.* **17**, 5085–5094
- Feldser, D., Agani, F., Iyer, N. V., Pak, B., Ferreira, G., and Semenza, G. L. (1999) *Cancer Res.* **59**, 3915–3918
- Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J., and Jelkmann, W. (1999) *Blood* **94**, 1561–1567
- Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M. M., Simons, J. W., and Semenza, G. L. (2000) *Cancer Res.* **60**, 1541–1545
- Gorlach, A., Diebold, I., Schini-Kerth, V. B., Berchner-Pfannschmidt, U., Roth, U., Brandes, R. P., Kietzmann, T., and Busse, R. (2001) *Circ. Res.* **89**, 47–54
- Spinella, F., Rosano, L., Di, C. V., Natali, P. G., and Bagnato, A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 27850–27855
- Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P. C., and Semenza, G. L. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3995–4004
- Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A. R., Ryan, H. E., Johnson, R. S., Jefferson, A. B., Stokoe, D., and Giaccia, A. J. (2000) *Genes Dev.* **14**, 391–396
- Fukuda, R., Hirota, K., Fan, F., Jung, Y. D., Ellis, L. M., and Semenza, G. L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 38205–38211
- Monteiro, H. P., and Stern, A. (1996) *Free Radic. Biol. Med.* **21**, 323–333
- Sun, Y., and Oberley, L. W. (1996) *Free Radic. Biol. Med.* **21**, 335–348
- Gonzalez-Pacheco, F. R., Caramelo, C., Castilla, M. A., Deudero, J. J., Arias, J., Yague, S., Jimenez, S., Bragado, R., and Alvarez-Arroyo, M. V. (2002) *Nephrol. Dial. Transplant.* **17**, 392–398
- Maulik, N. (2002) *Antioxid. Redox Signal.* **4**, 805–815
- Mikkelsen, R. B., and Wardman, P. (2003) *Oncogene* **22**, 5734–5754
- Millar, T. M., Phan, V., and Tibbles, L. A. (2007) *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 1165–1177
- Lu, Q., Jour'dheuil, F. L., and Jour'dheuil, D. (2007) *J. Cell. Physiol.* **212**, 827–839
- Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Sulciner, D. J., Gutkind, J. S., Irani, K., Goldschmidt-Clermont, P. J., and Finkel, T. (1996) *Biochem. J.* **318**, 379–382
- Ushio-Fukai, M., and Alexander, R. W. (2004) *Mol. Cell. Biochem.* **264**, 85–97
- Ushio-Fukai, M. (2007) *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 731–739
- Hordijk, P. L. (2006) *Circ. Res.* **98**, 453–462
- Colavitti, R., Pani, G., Bedogni, B., Anzevino, R., Borrello, S., Waltenberger, J., and Galeotti, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 3101–3108
- Ushio-Fukai, M. (2006) *Cardiovasc. Res.* **71**, 226–235
- Griendling, K. K., Sorescu, D., and Ushio-Fukai, M. (2000) *Circ. Res.* **86**, 494–501
- Castilla, M. A., Arroyo, M. V., Aceituno, E., Aragoncillo, P., Gonzalez-Pacheco, F. R., Texeiro, E., Bragado, R., and Caramelo, C. (1999) *Circ. Res.* **85**, 1132–1138
- Alvarez Arroyo, M. V., Castilla, M. A., Gonzalez Pacheco, F. R., Tan, D., Riesco, A., Casado, S., and Caramelo, C. (1998) *J. Am. Soc. Nephrol.* **9**, 1998–2004
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M., and Schaffner, W. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 6419

34. Mukhopadhyay, D., and Datta, K. (2004) *Semin. Cancer Biol.* **14**, 123–130
35. Naranjo-Suarez, S., Castellanos, M. C., Alvarez-Tejado, M., Vara, A., Landazuri, M. O., and del Peso, L. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 31895–31901
36. Ushio-Fukai, M., Tang, Y., Fukai, T., Dikalov, S. I., Ma, Y., Fujimoto, M., Quinn, M. T., Pagano, P. J., Johnson, C., and Alexander, R. W. (2002) *Circ. Res.* **91**, 1160–1167
37. Richard, D. E., Berra, E., and Pouyssegur, J. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 26765–26771
38. Haddad, J. J., and Land, S. C. (2001) *FEBS Lett.* **505**, 269–274
39. Maxwell, P., and Salnikow, K. (2004) *Cancer Biol. Ther.* **3**, 29–35
40. Tacchini, L., Dansi, P., Matteucci, E., and Desiderio, M. A. (2001) *Carcinogenesis* **22**, 1363–1371
41. Suda, O., Smith, L. A., d'Uscio, L. V., Peterson, T. E., and Katusic, Z. S. (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 506–511
42. Abid, M. R., Schoots, I. G., Spokes, K. C., Wu, S. Q., Mawhinney, C., and Aird, W. C. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 44030–44038
43. Ikeda, S., Yamaoka-Tojo, M., Hilenski, L., Patrushev, N. A., Anwar, G. M., Quinn, M. T., and Ushio-Fukai, M. (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 2295–2300
44. Abdelrahman, M., Mazzone, E., Bauer, M., Bauer, I., Delbosc, S., Cristol, J. P., Patel, N. S., Cuzzocrea, S., and Thiemermann, C. (2005) *Shock* **23**, 107–114
45. Al-Shabrawey, M., Bartoli, M., El-Remessy, A. B., Platt, D. H., Matragoon, S., Behzadian, M. A., Caldwell, R. W., and Caldwell, R. B. (2005) *Am. J. Pathol.* **167**, 599–607
46. Tzima, E. (2006) *Circ. Res.* **98**, 176–185
47. Beckman, J. S., and Koppenol, W. H. (1996) *Am. J. Physiol.* **271**, C1424–C1437
48. Chatterjee, P. K. (2005) *Lancet* **365**, 1890–1892
49. Fisher, J. W. (2003) *Exp. Biol. Med.* **228**, 1–14
50. Harris, A. L. (2002) *Nat. Rev. Cancer* **2**, 38–47

Agradecimientos

A esta tesis le ha costado salir, no quería terminar, se ve que le caí simpático y le ha costado mucho soltarme. Es algo curioso, porque si bien al principio el sentimiento era recíproco y sincero, a medida que pasaba el tiempo (los años más bien) se me iba desprendiendo esa capa de incondicional admiración dejando paso a otra más interna de sentido práctico, algo así como “Juanjo, todos estos resultados son muy bonitos pero es mejor compartirlos con la humanidad y dedicarse a otra cosa”. Pero ella no parecía pensar igual, y cuando sacaba el tema a discusión: “Tesis, tenemos que hablar, los resultados son suficientes y claros, ¡lo nuestro tiene que acabar!”, ella hacía oídos sordos y se salía por la tangente con un manido; “¿pero tu has repetido ese experimento que dio tan poca señal el control?, anda, anda, hazme una comprobación rapidita, no vaya a ser que tengamos mal los 50 últimos experimentos y haya que volver a empezar la tesis”. Bueno, como se suele decir: todo llega, todo acaba, o al menos es lo que uno tiene derecho a poder decir cuando por fin ve terminada (escrita, corregida, rescrita, recorregida, impresa, tasas pagadas, preleída y entregada en secretaría) una laaaarga tesis.

Todo el que ha pasado por un proceso parecido al que yo he tenido estos años sabe que el resultado final no es merito de uno mismo, sino producto de la ayuda, consejo, colaboración y participación de muchas personas. En mi caso tengo el agravante de haber conocido a mucha gente durante mi estancia en la Fundación. Tomad nota, una ventaja de las tesis largas; tu lista de amigos también se hace larga. Me gustaría agradecer a todas las personas que me han ayudado de un modo u otro con un GRACIAS bien clarito, por lo que iré de uno en uno o bien por prácticos grupitos, pero que nadie se ofenda por el sistema de clasificación, cualquier otro sería válido.

Primero y ante todo al Dr. Carlos Caramelo, me diste la oportunidad de hacer esto y, aunque no has podido verlo acabado, tu y yo sabemos que ya estaba terminado hace tiempo y que estábamos contentos con el resultado. No solo te doy las gracias, te doy la enhorabuena, es mérito tanto tuyo como mío. Hasta siempre Carlos.

Al Dr. Francisco Román González Pacheco, la mitad de esta tesis, gracias por la guía y consejo pero siempre con la libertad para poder pensar por mi mismo. Enhorabuena a ti también.

A la Fundación Conchita Rábago, al Instituto de Salud Carlos III y a la Fundación Renal Iñigo Álvarez de Toledo que han sufragado mis becas durante estos años.

A los Drs. Carmén Ayuso, Jesús Egido, Alberto Ortiz y Alberto Tejedor, por su dedicación, comprensión y preocupación por nuestro laboratorio.

Al personal de la Fundación Jiménez Díaz, limpieza, mantenimiento, informática, administración y unidad de diálisis. Muy especialmente a: Lola (déjate de excusas y vente algún viernes a comer con nosotros), Choni (la mejor con la aguja a este lado del

Manzanares), Loli, Vanesa, Nieves, Encarna, Régula, Isabel, Flor y Curra (las fotos son tuyas).

A los empleados de los mataderos Gypisa y Nombela, por todas las aortas.

A los Drs. Alberto Muñoz y Gregg L. Semenza por los plásmidos donados.

A los que han sido o son mis compañeros de Labo: Lara, Sonso, Mentxu, Susi, Mariví, Melón... digo Alai (aquí se te sigue echando de menos), Silvia (realmente eres más grande que pitufa, pero no pensaba reconocerlo hasta este momento, eso si, Jorge sigue siendo un Santo Varón), MAC (ligna ☺), Nando ("Correcto", es Comic Sans), Uth/Chuti/o raramente Ruth (no te quejes que podría haber sido otro apodo, sabes que lo hubiese puesto), Olaya... ¡ah!, que es con "l", Oyala... ¿en las dos?: Oyaya... ¿tampoco?.... vaya nombre Olalla... y Sergio-Chuache, el último gran fichaje (no he terminado Sergio, no puedes hablar).

A las chicas de la Complu: la Dr. María Victoria Cachafeiro (gracias por tu ayuda y dedicación), Eva (no, no hacen falta besos) y María (y la siguiente en leer ¿es?...)

A toda la gente de los Laboratorios de la Fundación: Mati (Microbiología), Arancha y Arantxa, Carletes, Raúl, Juanan, David, Vero, Luis y Dani (Fisiopatología ósea), Bea, Laura (Lípidos), Verónica, Nieves, Alicia (Metabolismo, nutrición y hormonas), Jose y Cristina (Neurología), Bea, Charlie, Carmencita, Gemma, Elena, Patri, Ester y Ester (Inmunología) y como no a los de "enfrente"... atención que son varios: Carmen (G), Marta, Luis, Pepe, Osquichu, Sebas, Julio (el de antes), Van, Alberto (Alfi), Eva, Cristina, Elsa, Virginia, Jon, Álvaro, Alberto, Almu, Rupi, Pi, Bego, M^aÁngeles, Bea, Loli, Puri, Guada, Oscar, Willy, Yosu, Sergio, Beñat, Julio (el de ahora) y el Primo Juan (Ole). Seguro que olvido a alguien; no ha sido mi intención.

A aquellos que me marcaron hace tiempo y que sin ellos yo no sería como soy, Agus, Iñigo, Oscar, Margarita, Cristina, Jesús, y Nerea (con ellos empecé), a Anita, Iratxisima, Amaranta, Danilu, Juanmanuelito, Amandisima y Sergi, ha pasado mucho ya, pero siempre os tengo en mente.

A mis compañeros de piso, que han sufrido las consecuencias de esta tesis, Pedro, Pocket, Mundi, Adrián (que realmente es adoptado), Fran y Phillip, lo he pasado genial con vosotros.

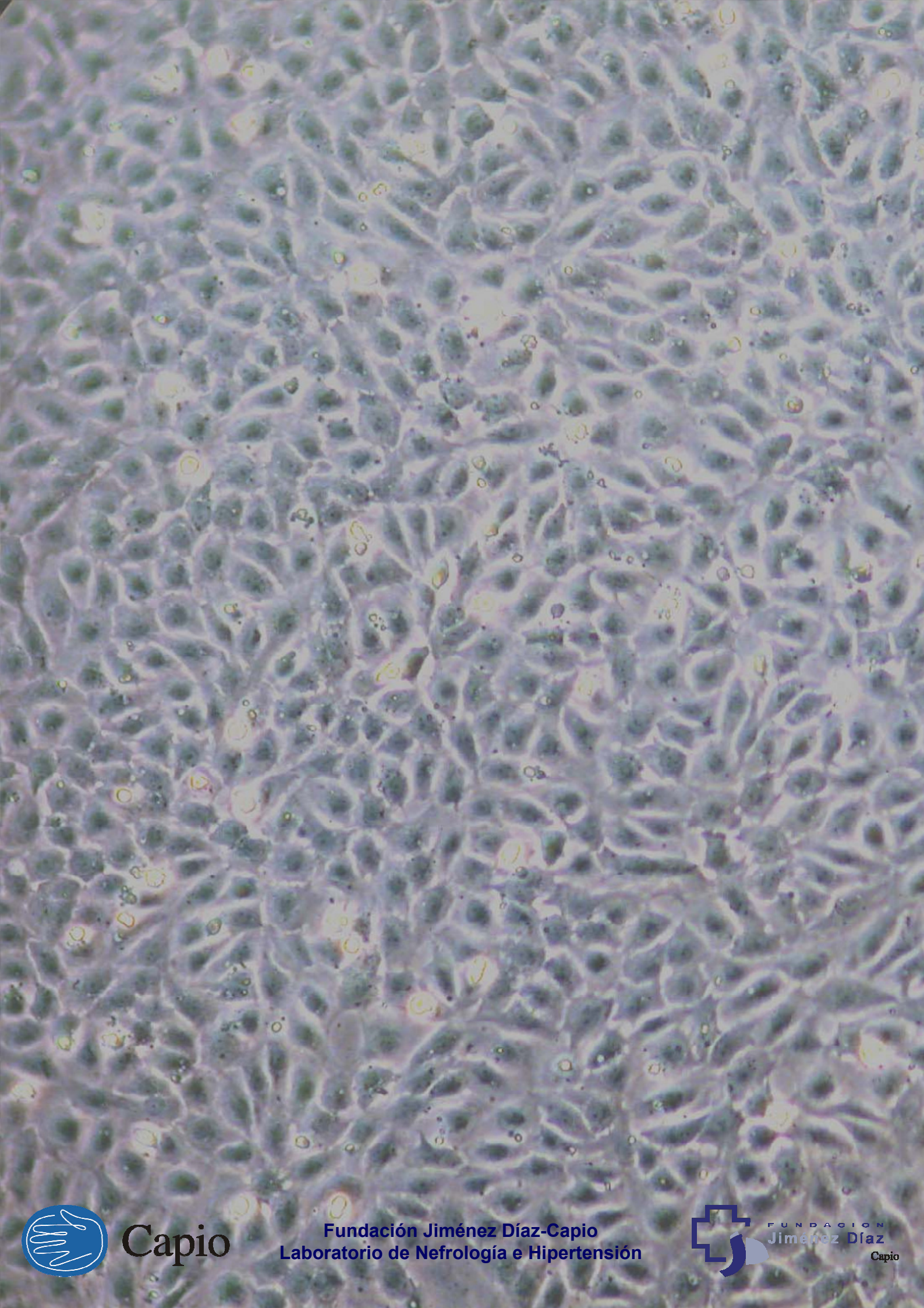
Al grupo del churromail mañanero y con los que, hagas lo que hagas, siempre será agradable y divertido, Alberto, Anny, Rubén, Ana, Carla, Marcos, Ramón, Vivi (y Albita), Tako, Juanfri, Noe, Anabel, Marina y de nuevo a Mentxu y Melón... digo Alai (que enchufe, estáis repes), os tengo un poco abandonados pero ya he acabado con la tesis,... que si, de verdad...

Y finalmente, a quienes dedico esta tesis, a mi Familia, a mis padres que siempre han estado ahí, cuidándome de todo, a Alejandra, mi milagro, por poner luz donde todo parece oscuro, y como no, a Ana, Alfredo y Guillermo, os estaré siempre agradecido y por supuesto a Marta, a quien siempre guardaré conmigo.

NOTA:

*Por si os lo estabais preguntando, los agradecimientos están al final porque un amigo muy sabio dijo una vez: "en una tesis, cada nuevo apartado va cobrando mayor importancia que el anterior".
Sois lo más importante, gracias otra vez.*

*Juan José Peña Deudero
En Madrid, a 28 de Abril de 2008*



Capio

Fundación Jiménez Díaz-Capio
Laboratorio de Nefrología e Hipertensión



FUNDACIÓN
Jiménez Díaz
Capio